

**STUDI PENGARUH TERAPI AIR ALKALI TERHADAP GAMBARAN  
HISTOPATOLOGI LAMBUNG DAN PROFIL PROTEIN SERUM  
TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL *INFLAMMATORY BOWEL  
DISEASE* (IBD) HASIL INDUKSI INDOMETASIN**

**SKRIPSI**

Oleh :

**AIDIL AKBAR SAIMIMA**

**125130101111069**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

**STUDI PENGARUH TERAPI AIR ALKALI TERHADAP GAMBARAN  
HISTOPATOLOGI LAMBUNG DAN PROFIL PROTEIN SERUM  
TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL *INFLAMMATORY BOWEL  
DISEASE* (IBD) HASIL INDUKSI INDOMETASIN**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :

**AIDIL AKBAR SAIMIMA**

**125130101111069**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

**STUDI PENGARUH TERAPI AIR ALKALI TERHADAP GAMBARAN  
HISTOPATOLOGI LAMBUNG DAN PROFIL PROTEIN SERUM  
PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL *INFLAMMATORY  
BOWEL DISEASE* (IBD) HASIL INDUKSI INDOMETASIN**

Oleh :

**AIDIL AKBAR SAIMIMA**

**125130101111069**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
Pada tanggal 07 Agustus 2018  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

**Pembimbing I**



**Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES**  
NIP. 19600903 198802 2 001

**Pembimbing II**



**drh. Fajar Shodiq Permata, M.Biotech**  
NIP. 19870601 201504 1 001

Mengetahui,

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya



**Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES**  
NIP. 19600903 198802 2 001

**LEMBAR PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Aidil Akbar Saimima  
Nim : 125130101111069  
Program Studi : Kedokteran Hewan  
Penulis Skripsi berjudul :

Studi Pengaruh Air Alkali Terhadap Gambaran Histopatologis Lambung Dan Profil Protein Serum Pada Tikus (*Rattus novergicus*) Model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) Hasil Induksi Indometasin.

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 2018

ng menyatakan,



(Aidil Akbar Saimima)  
NIM. 125130101111069



## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT Tuhan Yang Maha Esa karena telah memberikan rahmat dan karunia-Nya sehingga Skripsi yang berjudul **“Studi Pengaruh Air Alkali Terhadap Gambaran Histopatologis Lambung Dan Profil Protein Serum Pada Tikus (*Rattus novergicus*) Model Inflammatory Bowel Disease (IBD) Hasil Induksi Indometasin”** dapat terselesaikan, Sholawat serta salam semoga tetap dicurahkan kepada Nabi Muhammad SAW. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan. Penelitian ini adalah penelitian payung yang diketuai oleh Prof. Dr. Aulanni’am, drh., DES.

Dalam penyusunan skripsi ini penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada pihak- pihak yang telah membantu :

1. Prof. Dr. Aulanni’am, drh., DES dan drh. Fajar Shodiq Permata, M.Biotech selaku dosen pembimbing atas bimbingan, kesabaran, waktu, semangat dan kasih sayang yang telah diberikan.
2. drh. Indah Amalia Amri, M.Si dan drh. Ajeng Erika PH, M.Si selaku dosen penguji yang telah memberikan pengarahan dan masukan dengan kesabaran serta kasih sayang selama ujian Skripsi.
3. Prof. Dr. Aulanni’am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
4. Orangtua dan keluarga tercinta terutama mama ema tersayang yang senantiasa memberika dukungan, materi, semangat, doa, kasih sayang dan cinta serta motivasi yang diberikan kepada penulis.
5. Kolega 2012 D, teman-teman kelompok IBD dan Mba Ninik, Mba Pupik, Mba anita, Pak Har, Mba Anjar, Mba Tari, Mas Anton, Mas Adit, Denis dan Mas Hilman yang senantiasa atas motivasi semangat, inspirasi, bantuan, kebersamaan dan semua hal yang bermanfaat.
6. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan karya tulis ini yang tidak sempat disebutkan.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan Proposal Skripsi ini dapat memberikan manfaat dan wawasan tidak hanya bagi penulis namun juga bagi pembaca.

Malang, 2018

Penulis



**Studi Pengaruh Terapi Air Alkali Terhadap Gambaran Histopatologi  
Lambung Dan Profil Protein Serum Pada Tikus (*Rattus norvegicus*)  
Model Inflammatory Bowel Disease (IBD) Hasil Induksi  
Indometasin**

**ABSTRAK**

*Inflammatory Bowel Disease* (IBD) adalah penyakit peradangan kronis yang terjadi pada saluran pencernaan. Salah satu obat yang sering menimbulkan efek samping inflamasi adalah golongan obat *Nonsteroidal Anti Inflammatory Drugs* (NSAID) seperti indometasin yang menyebabkan inflamasi pada gastrointestinal dan dapat menyebabkan kerusakan pada lambung. Untuk melihat kerusakan yang ditimbulkan oleh penyakit *Inflammatory Bowel Disease* dapat dilihat pada perubahan jaringan lambung, dan sebagai biomarker terjadinya inflamasi dapat dilihat profil pita protein pada serum tikus. Air alkali mengandung hidrogen yang tinggi sebagai antioksidan berpotensi sebagai terapi IBD. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui potensi air alkali terhadap perubahan profil protein serum dan gambaran histopatologi lambung tikus *Inflammatory Bowel Disease* (IBD). Tikus IBD diinduksi indometasin dosis 15 mg/kg BB secara per oral. Terapi dibagi menjadi empat kelompok yaitu kontrol negatif, kontrol positif (IBD), kelompok terapi air alkali dengan volume pemberian 1 mL/ekor dan 2 mL/ekor. Profil protein serum diukur dengan menggunakan metode SDS PAGE dan pengamatan histopatologi lambung menggunakan pewarnaan *Hematoxylin Eosin*. Analisa data yang digunakan yaitu data kualitatif berupa perbedaan profil protein lambung dan gambaran histopatologi lambung tikus yang akan dianalisis dan disajikan secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan pemberian terapi air alkali mampu memperbaiki kerusakan organ lambung pada tikus model IBD yang ditandai dengan perbaikan sel epitel, berkurangnya edema dapat menghambat sintesis pita profil protein dengan berat molekul 127 kDa dengan terapi air alkali 2 mL/ ekor sebanyak dua kali sehari. Kesimpulan dari penelitian ini air alkali dapat digunakan sebagai terapi alternatif pada tikus model *Inflammatory Bowel Disease* berdasarkan perbaikan histopatologi lambung dan perbaikan profil protein.

**Kata kunci :** *Inflammatory Bowel Disease* (IBD), Indometasin, Air Alkali, Profil Protein Serum, Histopatologi Lambung.

**The Potency of Alkaline Water toward the Gastric Histopathology and Protein Profiles of Serum on *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) Rats (*Rattus novergicus*) Induced by Indometachin**

**ABSTRACT**

Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic inflammatory disease that occurs in the gastrointestinal tract. One of drugs cause side effect inflammation is a type of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) such as indometachine which cause gastrointestinal bleeding. Alkaline water containing high concentration of hydrogen soluble as an antioxidant that potentially used as an IBD therapy. The purpose of this research was to study the therapeutic of alkaline water in order to observe changes of gastric histopatology on IBD rats and serum protein profile as a biomarker of inflammation. The IBD rats were induced by indometachin with dose of 15 mg/kgBW orally. The rats were divided into four groups: negative control group, positive group (IBD), group of therapy alkaline water with dose of 1 mL / rat and 2 mL/ rat. Histopathologycal gastric evaluated microscopically using hematoxylin eosin staining and protein profile of the serum measured by SDS-PAGE method that will be analyzed and presented descriptively. The results showed therapy with 2mL/rat is the best dose that can repaired gastric damaged based on ephithelial cell, decreased level of and also can inhibit the synthesis of protein profile bands with molecular weight of 127 kDa. The conclusion of this study indicates that alkaline water therapy can repair gastric histopatology and serum protein profile of IBD rats, so that alkaline water can be used as an alternative therapy Inflammatory Bowel Disease rats.

**Key Words :** Inflammatory Bowel Disease (IBD), Indometachin, Alkaline Water, Gastric Histopathology, Serum Protein Profile .

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iii
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	iv
<b>ABSTRAK</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	viii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	x
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xii
<b>DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG</b> .....	xiii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Batasan Masalah .....	3
1.4 Tujuan .....	4
1.5 Manfaat .....	5
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	6
2.1 Inflammatory Bowel disease (IBD) .....	6
2.2 Hewan Coba Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) .....	9
2.3 Indometasin .....	10
2.4 <i>Reactive Oxygen Species</i> (ROS) .....	11
2.5 C-Reactive Protein .....	12
2.6 Lambung .....	14
2.7 Potensi Air Alkali sebagai terapi IBD .....	19
<b>BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN</b> .....	23
3.1 Kerangka Konseptual .....	23
3.2 Hipotesis Penelitian .....	26
<b>BAB 4. METODE PENELITIAN</b> .....	27
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	27
4.2 Materi Penelitian .....	28
4.3 Sampel Penelitian .....	29
4.4 Rancangan Penelitian .....	29
4.5 Variabel Penelitian .....	30
4.6 Tahapan Penelitian .....	30
4.6.1 Persiapan Hewan Coba .....	30
4.6.2 Persiapan Indometasin .....	31
4.6.3 Persiapan Air Alkali .....	31
4.6.4 Pengambilan Organ Lambung .....	31
4.6.5 Isolasi Serum .....	32
4.6.6 Elektroforesis S.D.S .....	33
4.6.6.1 Persiapan .....	33
4.6.6.2 Injeksi Sampel dan Running .....	33
4.6.6.3 Perlakuan Setelah Running .....	34



4.6.6.4 Penentuan Berat Molekul .....	34
4.6.7 Pembuatan Preparat Histopatologi .....	35
4.7.7.1 Fiksasi .....	35
4.7.7.2 Dehidrasi .....	35
4.7.7.3 Penjernihan ( <i>Clearing</i> ) .....	35
4.7.7.4 Infiltrasi Parafin .....	35
4.7.7.5 Penanaman Jaringan ( <i>Embedding</i> ) dan <i>Sectioning</i> .....	36
4.7 Pengamatan Histopatologi .....	38
4.8 Analisa Data .....	38
<b>BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	39
5.1 Studi Pengaruh Terapi Air Alkali terhadap Gambaran Histopatologi Lambung Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) model <i>Inflammatory Bowel Disease</i> (IBD) Hasil Induksi Indometasin .....	39
5.2 Pengaruh Induksi Indometasin terhadap Profil Protein Serum Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) .....	47
<b>BAB 6. Penutup</b> .....	54
6.1 Kesimpulan .....	54
6.2 Saran .....	54
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	55
<b>LAMPIRAN</b> .....	60



## DAFTAR TABEL

	Halaman
<b>4.1</b> Tatalaksana Penelitian .....	29
<b>5.1</b> Perbedaan Berat Molekul (BM) Profil Pita Protein .....	49



## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Anatomi Lambung Tikus .....	15
2.2 Histologi lambung normal .....	17
2.3 Histopatologi lambung yang mengalami IBD.....	18
2.4 Prinsip elektrolisis air.....	20
2.5 Proses Hidrogen Aktif dalam Air Alkali.....	21
3.1 Kerangka Konseptual .....	23
5.1 Gambaran Histologi Lambung Tikus Kontrol Negatif dengan pewarnaan HE .....	40
5.2 Gambaran Histopatologi Lambung Tikus <i>Inflammatory Bowel Disease</i> (Kontrol Positif) dengan pewarnaan HE .....	42
5.3 Gambaran Histopatologi lambung tikus kelompok tikus terapi 1 (dosis 1 mL/ekor) dengan pewarnaan HE .....	44
5.4 Gambaran Histopatologi lambung tikus kelompok tikus terapi 2 (dosis 2 mL/ekor) dengan pewarnaan HE .....	45
5.5 Profil Pita Protein Lambung (SDS-PAGE 12%) .....	48

**DAFTAR LAMPIRAN**

Lampiran	Halaman
1. Sertifikat Laik Etik.....	56
2. Kerangka Operasional.....	57
3. Isolasi Serum .....	58
4. Profil Protein dengan Teknik SDS-PAGE .....	59
5. Pembuatan Preparat Histologi Organ Lambung .....	61
6. Pewarnaan Hematoksilin Eosin.....	62
7. Kurva Standar Marker.....	63
8. Penghitungan Berat Molekul Protein .....	64



## DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

$\mu\text{l}$	: Mikroliter
$\mu\text{mol}$	: Mikromol
BNJ	: Beda Nyata Jujur
Ca	: Calsium
CD	: Crohn disease
COX-1	: siklooksigenase-1
COX-2	: siklooksigenase-2
DMBI	: Desmetildesklorobenzoindometasin
DMI	: Desmetilindometasin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrogen peroksida
HE	: Hematoksilin eosin
IBD	: Inflammatory Bowel Disease
IL-1 $\beta$	: Interleukin-1beta
Li	: Lithium
Mg	: Magnesium
mL	: Mililiter
MPO	: Myeloperoxidase
NaCl	: Natrium Clorida
NF- $\kappa$ B	: Nuclear factor kappa beta
NO	: Nitrat Oksida
NSAID	: Nonsteroidal Anti Inflammatory Drugs
ORP	: oxidation reduction potensial
PBS	: Phosphate Buffered Saline pH : Potential of Hydrogen
ROS	: Reactive Oxygen Species
Th-1	: Sel T-helper 1
Th-2	: Sel T-helper 2
TNF- $\alpha$	: Tumor Necrosis Factor-alfa
UC	: Ulcerative colitis



## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

*Inflammatory Bowel Disease* (IBD) merupakan suatu penyakit inflamasi kronis yang terjadi pada saluran pencernaan dan dimediasi oleh sistem imun (Amir and Rami, 2010). *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) dibagi menjadi *Crohn's disease* (CD), *Ulcerative colitis* (UC), dan IBD tanpa tanda- tanda yang membedakan (ragu- ragu atau *Indetermine colitis* [IC]). (Gareth and Madhur, 2010). Berdasarkan laporan terbaru, terjadi peningkatan yang stabil pada insiden global IBD. Telah dilaporkan nilai prevalensi tertinggi untuk IBD berada di Eropa (UC, 505 per 100.000 orang; CD, 322 per 100.000 orang) dan Amerika Utara (UC, 249 per 100.000 orang; CD, 319 per 100.000 orang (Natalie *et al*, 2012).

*Inflammatory Bowel Disease* (IBD) dikenal sebagai kelainan gastrointestinal pada manusia; namun, kelainan ini juga ditunjukkan dan seringkali ditemukan pada hewan (Matteo, 2010). Pada hewan, menurut catatan medis the Queen Mother Hospital untuk hewan kasus *Inflammatory Bowel Disease* pada 1 Agustus 2003 sampai 31 Desember 2009 tercatat ada 546 anjing dengan 86 ras yang berbeda. Gejala umum pada anjing yang mengalami IBD adalah penurunan berat badan terus-menerus dan diare (Kathrani *et al.*, 2011).

*Inflammatory Bowel Disease* ditandai dengan proses inflamasi usus kronis dengan berbagai komponen yang berkontribusi terhadap patogenesis

penyakit termasuk faktor lingkungan (seperti merokok atau penggunaan obat golongan NSAID), latar belakang genetik, flora normal usus dan sistem kekebalan tubuh inang (Amir and Rami, 2010). Penggunaan obat antiinflamasi non-steroid (NSAID) seperti indometasin dapat menimbulkan efek samping berupa terjadinya penyakit IBD, sehingga pembuatan hewan model *Inflammatory Bowel Disease* dapat dilakukan dengan induksi indometasin (Piepoli *et al.*, 2005). Indometasin merupakan derivat indol-asam asetat, obat ini sudah dikenal sejak 1963 untuk pengobatan *arthritis rheumatoid* dan *osteoarthritis* (Scholz *et al.*, 2011). NSAID menyebabkan cedera pada saluran gastrointestinal melalui berbagai mekanisme lokal dan sistemik. Pemilihan induksi indometasin karena peradangan yang ditimbulkan tidak terlokalisasi di usus besar tetapi di seluruh bagian gastrointestinal termasuk lambung, serta indometasin lebih mudah didapatkan (Piepoli *et al.*, 2005). Untuk melihat kerusakan yang ditimbulkan oleh penyakit *Inflammatory Bowel Disease* dapat dilihat pada perubahan histologi sel lambung. Proses pemeriksaan profil protein serum dapat dijadikan sebagai biomarker terjadinya penyakit *Inflammatory Bowel Disease*.

Air alkali merupakan air yang diperoleh dari proses elektrolisis air, pertama kali dikembangkan di Jepang. Jepang dan Korea menggunakan air alkali sebagai bahan baru untuk peningkatan fermentasi usus yang abnormal, diare kronis, *gastric hyperacidity* dan *dyspepsia*. Penggunaan air alkali dapat diterapkan dalam terapi untuk penyakit IBD karena memiliki kandungan antioksidan yang tinggi, pH basa yang dapat menyeimbangkan asam

lambung, molekul air mikro kluster, nilai ORP negatif, dan air alkali memiliki kandungan hidrogen terlarut sangat tinggi hal ini diharapkan dapat menetralkan *Reactive Oxygen Species* (ROS).

Penggunaan obat dalam terapi IBD sering tidak memadai dan biasanya disertai dengan efek samping. Maka pada penelitian ini mempelajari efektifitas pada air alkali untuk melihat profil protein dari serum darah dan untuk melihat perubahan gambaran histopatologi dari lambung. Pada penelitian ini digunakan hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) yang diinduksi indometasin dosis 15 mg/kg BB (Aulanni'am *et al.*, 2012).

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka rumusan masalah dari penelitian ini yaitu:

1. Apakah terapi air alkali dapat memperbaiki gambaran histopatologi lambung tikus (*Rattus norvegicus*) *Inflammatory Bowel Disease* hasil induksi indometasin?
2. Apakah terapi air alkali berpengaruh terhadap perubahan profil protein serum darah tikus IBD hasil induksi indometasin?

### 1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah, maka permasalahan dibatasi pada :

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar, umur 8-12 minggu dan berat rata-rata 150-200 gram yang diperoleh dari Laboratorium LSIH, Universitas Brawijaya, Malang.
2. Air alkali digunakan merupakan air yang didapatkan dari proses elektrolisis.
3. Pembuatan keadaan *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) pada hewan model tikus putih dilakukan dengan cara pemberian indometasin sebanyak 15 mg/kg BB secara per oral sebanyak 1 kali pada hari ke-8.
4. Volume air alkali yang digunakan adalah 1 mL/ ekor dan 2 mL/ ekor secara per oral.
5. Variabel yang diamati adalah perbedaan gambaran profil protein darah tikus yang dianalisis menggunakan metode SDS-PAGE dan gambaran histopatologi lambung dengan metode pewarnaan HE untuk mengamati kerusakan jaringan lambung.

### 1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui bahwa terapi air alkali dapat memperbaiki histopatologi lambung tikus (*Rattus norvegicus*) *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) hasil diinduksi indometasin.
2. Mengetahui pengaruh terapi air alkali terhadap perbedaan profil protein serum darah tikus (*Rattus norvegicus*) model *Inflammatory Bowel Disease* induksi indometasin yang mendapat terapi pemberian air alkali dibandingkan dengan profil protein tikus kontrol.

### 1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi informasi dalam kajian ilmiah tentang manfaat dari potensi dari air alkali yang berasal dari Indonesia dapat digunakan sebagai terapi *Inflammatory Bowel Disease* (IBD). Sehingga dengan adanya penelitian ini dapat diketahui pengaruh dari air alkali sebagai anti inflamasi pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) hasil induksi indometasin terhadap perubahan profil protein serum darah pada tikus dan gambaran histopatologi lambung.





## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 *Inflammatory Bowel Disease (IBD)*

Inflammatory bowel disease (IBD) merupakan penyakit idiopatik, yang diperkirakan melibatkan reaksi imun dalam tubuh terhadap saluran pencernaan. Dua tipe mayor daripada penyakit ini adalah Ulcerative Colitis (UC) dan Crohn Disease (CD). Diperkirakan bahwa 1,5 juta orang Amerika menderita UC dan CD. Etiologi tidak diketahui, meskipun keduanya dianggap muncul dari respon imun yang terganggu terhadap usus individu dengan predisposisi genetik. (Korpacka *et al.*, 2009).

Karakteristik respon inflamasinya berbeda, pada CD biasanya menyebabkan inflamasi transmural dan kadang-kadang terkait dengan granuloma, sedangkan di UC biasanya inflamasi terbatas pada mukosa dan submukosa. Penyakit Crohn (PC) terjadi pada saluran pencernaan bagian atas terutama mulut, esophagus, lambung dan usus halus, sedangkan kolitis ulseratif (KU) terpusat pada usus besar, rektum dan peradangan terjadi pada lapisan usus (Korpacka *et al.*, 2009).

Penyakit Crohn (PC) ditandai dengan bentuk pola khas yakni adanya striktur dan fistula. Inflamasi pada PC ditandai dengan fibrosis dan proliferasi histiosit di lapisan submukosa. Lesi pada PC bersifat diskontinyu sehingga akan ditemukan area normal diantara daerah lesi. Hal ini menjadi pembeda dengan KU dan menjadi penanda patologis khusus terjadinya PC pada penderita IBD. Lesi pada KU ditandai dengan berbagai derajat

ulserasi, hemoragi, edema dan degenerasi epitel pada lapisan mukosa kolon serta hilangnya sel goblet. Kerusakan epitel lapisan mukosa pada KU dalam tingkat berat secara berkelanjutan akan melebar ke lapisan submukosa bahkan muskularis eksterna. Peradangan hampir tidak mungkin terjadi pada area usus halus kecuali jika di ileum terminalis terdapat peradangan. Sementara itu, keterlibatan kolon hampir selalu terjadi pada KU (Kelompok Studi IBD, 2011).

Pada kasus IBD ditemukan Focal cryptitides di lambung dan/atau mukosa duodenum pada pasien dengan penyakit IBD sub tipe klinis Crohn Diseases. Dalam penelitian yang dipaparkan oleh Danelius *et al.*, (2009), menyimpulkan bahwa Inflammatory Bowel Diseases dapat menyebabkan lesi pada lambung dan duodenum pada sub tipe CD. Pada gambaran histopatologi lambung dengan pewarnaan HE pada penderita IBD sub tipe klinis Crohn disease tampak mukosa lambung menunjukkan infiltrasi sel-sel inflamasi di sekitar kelenjar pada pasien dengan penyakit Crohn (CD).

Penyakit ini sering ditandai dengan gejala seperti diare, pendarahan dubur, penurunan berat badan dan panas. Selain itu, gejala lain yang ditemukan pada berbagai organ antara lain mata merah, pandangan buram, lesi pada mulut, sakit pada persendian yang disertai ruam merah dan luka pada kulit terutama bagian bawah kaki (Neuman and Nanau, 2011).

Jalur akhir umum daripada patofisiologi IBD adalah inflamasi pada mukosa traktus intestinal menyebabkan ulserasi, edema, perdarahan, kemudian hilangnya air dan elektrolit. Banyak mediator inflamasi yang telah

diidentifikasi pada IBD, dimana mediator- mediator ini memiliki peranan penting pada patologi dan karakteristik klinik penyakit ini. Sitokin yang dikeluarkan oleh makrofag karena respon daripada berbagai rangsangan antigenik, berikatan dengan reseptor-reseptor yang berbeda, kemudian menghasilkan efek- efek autokrin, parakrin, dan endokrin. Sitokin juga akan mendiferensiasikan limfosit menjadi berbagai tipe sel T. Sel T helper tipe 1 (T H -1) berhubungan dengan CD, sedangkan T H -2 berhubungan dengan UC. Respon imun inilah yang akan merusak mukosa intestinal dan menyebabkan proses inflamasi yang kronis (Danastri dan Ida, 2011). Berdasarkan Suryanto (2003), menyatakan bahwa kerusakan pada jaringan akan menyebabkan produksi sitokin pro-inflamasi dan aktivasi neutrophil.

Patogenesis *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) diawali dengan pengenalan antigen luminal pada mukosa usus pada *Antigen-presenting cells* (APCs) yang menginduksi produksi sel T sehingga menyebabkan terjadinya inflamasi. Mekanismenya terbagi menjadi dua yaitu pada penyakit Crohn (PC) yang akan mengeluarkan sitokin seperti  $\text{TNF-}\alpha$ , interleukin-12 dan interferon- $\gamma$  melalui bantuan sel T helper 1 (Th1) sehingga dapat menginduksi terjadinya inflamasi khususnya pada organ pencernaan. Mekanisme yang kedua yaitu pada penyakit kolitis ulseratif (KU) yang dikode oleh sel T helper 2 (Th2) yang mengeluarkan sitokin antara lain interleukin-4 dan interleukin-13 (Solanki *et al*, 2010). Sementara itu, respon imun pada kolitis ulseratif juga ditandai dengan meningkatnya produksi IgG1 oleh sel Th2 dan produksi

sitokin proinflamasi seperti IL-1, IL-6, IL-8 dan TNF- $\alpha$  oleh sel Th1 terutama ketika terjadi aktivasi makrofag di lamina propria (Yamada, 2005).

## 2.2 Hewan Coba Tikus (*Rattus norvegicus*)

Tikus *Rattus norvegicus* merupakan hewan yang umum digunakan dalam penelitian karena mudah dipelihara, secara garis besar fungsi, bentuk organ serta proses biokimianya antara tikus dan manusia memiliki banyak kesamaan. Tikus memiliki beberapa keunggulan yaitu pemeliharaan dan perawatannya mudah, kemampuan reproduksi tinggi dan masa kebuntingan singkat. Rata-rata berat badan umum tikus jantan dewasa berkisar antara 267 sampai 500 gram dan betina 225 sampai 325 gram (Suckow, 2006).

Klasifikasi Tikus putih dalam sistematika hewan percobaan adalah sebagai berikut:

Filum : Chordata

Subfilum : Vertebrata

Classis : Mammalia

Subclassis : Placentalia

Ordo : Rodentia

Familia : Muridae

Genus : *Rattus*

Species : *Rattus norvegicus*

*Rattus norvegicus* merupakan hewan coba yang sering digunakan dalam penelitian karena berbagai pertimbangan, antara lain omnivora, pemeliharaan



dan penanganan yang mudah, potensi reproduksi tinggi, masa bunting pendek, dan resisten terhadap pakan yang mengandung kolesterol (Sirois, 2005). Selain itu, tikus mudah diberikan perlakuan secara oral. Tikus ini memiliki kebutuhan pakan yaitu 28 gr/hari. Menurut Corridoni *et al.*, (2004), menyatakan bahwa tikus digunakan sebagai hewan model IBD karena mudah diinduksi secara kimia. Tikus putih juga merupakan hewan yang ideal untuk uji toksikologi karena memiliki fisiologis yang mirip dengan manusia (Kusumawati, 2004).

Pembuatan hewan model *Inflammatory Bowel Disease* dengan cara pemberian indometasin karena salah satu penyebab IBD adalah efek samping dari penggunaan obat golongan NSAID seperti indometasin. Indometasin merupakan obat yang digunakan untuk pengobatan *Rheumatoid Arthritis*. Indometasin merupakan salah satu obat NSAID yang sangat efektif dalam menekan kejadian inflamasi, namun dalam penggunaan jangka panjang indometasin mampu menyebabkan IBD pada saluran pencernaan (Kazuhide *et al.*, 2009).

### 2.3 Indometasin

Indometasin adalah obat anti-inflamasi yang termasuk golongan NSAID. Golongan obat ini sering digunakan untuk pengobatan penyakit karena dapat menghilangkan/mengurangi tanda dan gejala radang. Indometasin bekerja dengan menghambat enzim siklooksigenase yang mengkonversi asam arakidonat menjadi prostaglandin. *Siklooksigenase*

(COX) mempunyai dua isoform yaitu COX-1 dan COX-2, Kedua isoform mengkatalisir perubahan asam arakidonat menjadi endoperoksidase (termasuk didalamnya prostaglandin) (Indraswari dkk., 2004). Absorpsi indometasin setelah pemberian oral cukup baik yaitu 92-99%, indometasin terikat pada protein plasma yang metabolismenya terjadi di hepar. Diekskresikan dalam bentuk asal maupun metabolit.

Pemberian indometasin memberikan efek pada saluran pencernaan meliputi nyeri abdomen, diare dan perdarahan saluran pencernaan. Mekanisme kerusakan usus akibat indometasin ditunjukkan oleh penurunan prostaglandin mukosa. Penurunan prostaglandin mukosa maka tidak ada perlindungan terhadap *barier* mukosa dan peningkatan motilitas usus yang dilanjutkan dengan adanya penyerbuan enterobakteri. Penyerbuan bakteri menyebabkan aktivasi makrofag, aktivasi neutrofil dan pembentukan ROS sehingga menyebabkan kerusakan usus. Indometasin dapat meredakan gejala peradangan seperti nyeri, tetapi dapat menyebabkan kerusakan usus (Takeuchi *et al.*, 2003).

Dosis pemberian indometasin adalah sebesar 15 mg/kg BB per oral yang diinkubasi selama 24 jam (Aulanni'am *et al.*, 2012) untuk dapat menghasilkan kolon yang terinfeksi IBD. Asupan oral indometasin pada tikus (*Rattus norvegicus*) dosis 15-16 mg/kg BB dapat menginduksi ulserasi pada mukosa, edema dan perdarahan (Krieglstein *et al.*, 2001).

## 2.4 *Reactive oxygen spesies (ROS)*

*Reactive oxygen spesies (ROS)* adalah radikal bebas dan senyawa yang mudah membentuk radikal bebas yang cenderung reaktif dan bereaksi dengan senyawa lain. Di dalam tubuh, ROS cenderung bereaksi dengan jaringan sehingga menimbulkan reaksi berantai yang menimbulkan kerusakan jaringan (Chertow, 2004). Produksi ROS yang meningkat dapat merusak sel dengan cara merusak membran sel tersebut. ROS akan menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid membran sel. Peroksidasi ini akan mempengaruhi fluiditas membran, *cross-linking* membran, serta struktur dan fungsi membran (Powers and Jackson, 2008).

Indometasin dapat meningkatkan pembentukan *Reactive Oxygen Species (ROS)* (Takeuchi *et al.*, 2003). *Reactive oxygen spesies (ROS)* dapat bereaksi dan menyebabkan kerusakan di dalam sel. Respon stress meliputi serangkaian perubahan protein (Iwama *et al.*, 2004). ). Protein fase akut untuk menggambarkan dan secara sensitif sebagai *marker* sistemik peradangan dan kerusakan jaringan adalah C- reaktif protein (CRP).

## 2.5 C-Reactive Protein

C-reactive protein (CRP) merupakan protein fase akut yang berfungsi sebagai penanda awal peradangan atau infeksi. Protein ini disintesis di hati dan secara normal ditemukan pada konsentrasi kurang dari 10 mg / L dalam darah. Selama terjadinya infeksi penyakit atau inflamasi, kadar CRP meningkat pesat dalam 6 sampai 8 jam dan puncaknya pada tingkat hingga

350-400 mg / L setelah 48 jam. CRP mengikat fosfokolin diekspresikan pada permukaan sel yang rusak, serta polisakarida dan peptosaccharides yang ada pada bakteri, parasit dan jamur. Protein ini mengikat dan mengaktifkan kaskade komplemen klasik dari sistem kekebalan tubuh dan memodulasi aktivitas sel fagosit, mendukung peran CRP dalam opsonisasi (yaitu proses dimana patogen ditandai untuk konsumsi dan kerusakan oleh fagosit) dari agen infeksi dan sel yang mati. Ketika peradangan atau kerusakan jaringan teratasi, tingkat CRP menurun, membuatnya menjadi markeryang berguna untuk monitoring aktivitas penyakit (WHO, 2014).

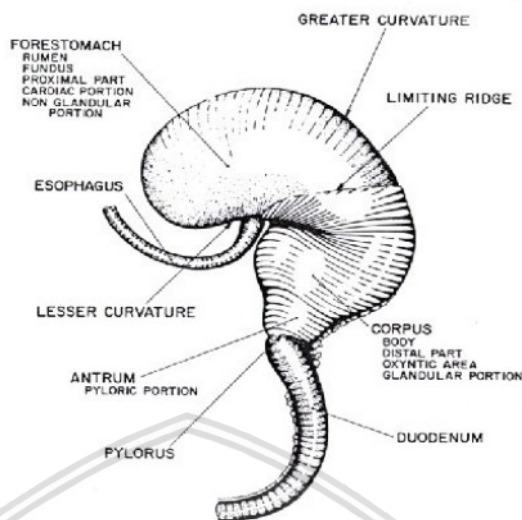
Berbagai tingkat CRP dalam menanggapi peradangan atau infeksi telah dibandingkan terhadap protein fase akut lainnya, termasuk serum ferritin dan serum retinol (indikator besi tubuh dan status vitamin A). Kadar serum feritin meningkat dalam setiap proses infeksi atau inflamasi, sedangkan kadar serum retinol menurun. Oleh karena itu, adanya peradangan atau infeksi yang berpotensi mengakibatkan kekurangan vitamin A dan kekurangan zat besi (WHO, 2014). Dalam menentukan kehadiran CRP sebagai marker terjadinya inflamasi jaringan dapat digunakan pengamatan profil protein dengan menggunakan metode elektroforesis. Metode karakterisasi protein dengan menggunakan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). SDS-PAGE merupakan salah satu metode untuk menganalisis protein dengan memisahkan pita-pita protein yang ada di dalam sampel berdasarkan berat molekulnya (Wetermeier, 2004).

C-reactive protein merupakan komponen sistem kekebalan, yaitu sekelompok protein dalam tubuh yang diproduksi pada kondisi infeksi atau trauma. Senyawa CRP termasuk dalam protein keluarga pentraksin, yang tersusun atas 5 sub-unit polipeptida non glikolisasi yang identik, dimana setiap sub unitnya mengandung 206 asam amino. Protomer protein tersebut berupa gugus simetris pentametik yang berputar. Setiap protomer menciri dengan adanya lipatan lektin, yang terdiri dari dua lapis  $\beta$  bersama topologi yang datar.

Berdasarkan strukturnya, CRP memiliki berat molekul 115.000 – 140.000 Dalton (Adji Dirgo, 2012). Sedangkan menurut Jialal dkk. (2004), berat molekul CRP adalah 118.000 Dalton. Berat molekul tersebut diperoleh dari subunit yang identik yang menyerupai bentukan sepatu kuda (Adji Dirgo, 2012).

## 2.6 Lambung

Lambung adalah bagian dari saluran pencernaan yang dapat mekar paling besar. Lambung menerima makanan dan bekerja sebagai penampung untuk jangka waktu pendek. Semua makanan dicairkan dan dicampur dengan asam HCl sehingga dapat dicerna oleh usus (Pearce, 2006). Dalam keadaan kosong, lambung menyerupai tabung bentuk J, dan bila penuh, berbentuk seperti buah pir raksasa. Lambung terdiri dari kardia, fundus besar seperti kubah, badan utama atau korpus dan pilorus (Price & Wilson, 2006).



**Gambar 2.1** Anatomi lambung tikus (Baker, *et al.*, 1979)

Lambung memiliki dua fungsi utama yaitu, fungsi pencernaan dan fungsi motorik. Fungsi pencernaan dan sekresi lambung berkaitan dengan pencernaan protein, sintesis dan sekresi enzim-enzim pencernaan. Selain mengandung sel-sel yang mensekresi mukus, mukosa lambung juga mengandung dua tipe kelenjar tubular yang penting yaitu kelenjar oksintik (gastrik) dan kelenjar pilorik. Kelenjar oksintik terletak pada bagian fundus dan korpus lambung, meliputi 80% bagian proksimal lambung. Kelenjar pilorik terletak pada bagian antral lambung. Kelenjar oksintik bertanggung jawab membentuk asam dengan mensekresikan mukus, asam hidroklorida (HCl), faktor intrinsik dan pepsinogen. Kelenjar pilorik berfungsi mensekresikan mukus untuk melindungi mukosa pilorus, juga beberapa pepsinogen, renin, lipase lambung dan hormon gastrin (Guyton and Hall, 2007).

Fungsi motorik lambung, yaitu menyimpan makanan dalam jumlah besar sampai makanan tersebut dapat ditampung pada bagian bawah saluran pencernaan, mencampur makanan tersebut dengan sekret lambung sampai

membentuk suatu campuran setengah padat yang dinamakan kimus, dan mengeluarkan makanan perlahan-lahan dari lambung masuk ke usus halus dengan kecepatan yang sesuai untuk pencernaan dan absorpsi oleh usus halus (Guyton dan Hall, 2007). Sebagai fungsi pencernaan dan sekresi yaitu pencernaan protein oleh pepsin dan HCl, sintesis dan pelepasan gastrin yang dipengaruhi oleh protein yang dimakan, sekresi mukus yang membentuk selubung dan melindungi lambung serta sebagai pelumas sehingga makanan lebih mudah diangkut, sekresi bikarbonat bersama dengan sekresi gel mukus yang berperan sebagai barier dari asam lumen dan pepsin (Price and Wilson, 2006).

Mukosa lambung mengandung dua tipe kelenjar tubular yang penting yaitu kelenjar oksintik (gastrik) dan kelenjar pilorik. Kelenjar oksintik terletak pada bagian fundus dan korpus lambung yang bertanggungjawab membentuk asam dengan mensekresikan mukus, asam hidroklorida (HCl), faktor intrinsik dan pepsinogen. Kelenjar pilorik berfungsi mensekresikan mukus untuk melindungi mukosa lambung, juga beberapa pepsinogen, renin, lipase lambung dan hormon gastrin (Guyton dan Hall, 2007). Sebagai fungsi pencernaan dan sekresi, yaitu pencernaan protein oleh pepsin dan HCl, sintesis dan pelepasan gastrin dipengaruhi oleh protein yang dimakan, sekresi mukus yang membentuk selubung dan melindungi lambung serta sebagai pelumas sehingga makanan lebih mudah diangkut, sekresi bikarbonat bersama dengan sekresi mukus yang berperan sebagai barier dari asam lumen dan pepsin (Price dan Wilson, 2005).



Lambung memiliki empat bagian yaitu cardia, fundus, *body* dan pylorus. dinding lambung terdiri atas empat lapisan yaitu mukosa, submukosa, muskularis eksterna dan serosa. lapisan mukosa terdiri atas epitel kolumnar selapis yang masuk dalam lamina propria membentuk *gastric pit*. Semua kelenjar lambung memiliki dua komponen yaitu bagian foveola (kripta, pit) dan bagian sekresi (kelenjar). Kardia lambung berbatasan dengan esofagus yang ditunjukkan adanya peralihan epitel skuamus simplek menjadi kolumnar simplek sedangkan bagian pylorus berbatasan dengan duodenum yang ditandai dengan adanya epitel kolumnar yang tidak memiliki sel kelenjar namun terlihat adanya kripta *lyberkuhn* dan kelenjar brunner (Junquiera *et al.*, 2004).

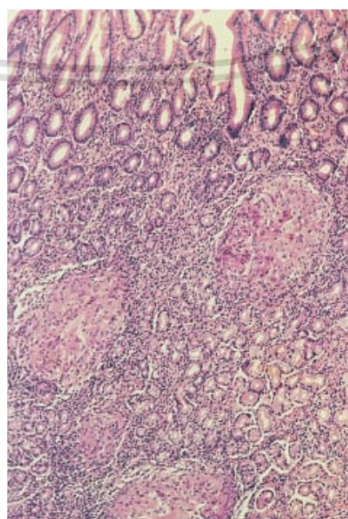


**Gambar 2.2** Histologi lambung normal (Bloom & Fawcett, 2004).

Mukosa lambung mengandung dua tipe kelenjar tubular yang penting yaitu kelenjar oksintik (gastrik) dan kelenjar pilorik. Kelenjar oksintik terletak pada bagian fundus dan korpus lambung yang bertanggungjawab membentuk asam dengan mensekresikan mukus, asam hidroklorida (HCl), faktor intrinsik dan pepsinogen. Kelenjar pilorik berfungsi mensekresikan mukus untuk

melindungi mukosa lambung, juga beberapa pepsinogen, renin, lipase lambung dan hormon gastrin (Guyton dan Hall, 2007). Sebagai fungsi pencernaan dan sekresi, yaitu pencernaan protein oleh pepsin dan HCl, sintesis dan pelepasan gastrin dipengaruhi oleh protein yang dimakan, sekresi mukus yang membentuk selubung dan melindungi lambung serta sebagai pelumas sehingga makanan lebih mudah diangkut, sekresi bikarbonat bersama dengan sekresi mukus yang berperan sebagai barier dari asam lumen dan pepsin (Price dan Wilson, 2005).

Selain menyerang ileum, penyakit IBD (CD) juga telah dilaporkan menyerang saluran pencernaan bagian atas yaitu lambung. Lesi yang ditemukan untuk penyakit CD pada saluran pencernaan bagian atas sangat bervariasi seperti aphthae, erosi, ulserasi, lesi, striktur, dan penampakan seperti *notch*. Hasil analisa menunjukkan adanya CD di lambung ditunjukkan oleh infeksi dari bakteri *Helicobacter pylori* dan adanya granuloma (Sakuraba *et al*, 2014).

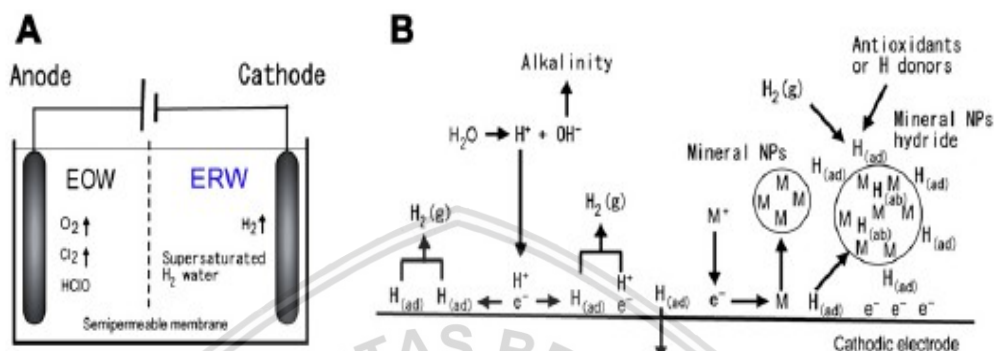
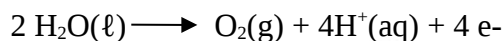


**Gambar 2.3** Histopatologi lambung yang mengalami IBD (Geboes, 2003).

## 2.7 Potensi air alkali sebagai terapi *Inflammatory Bowel Disease (IBD)*

Air alkali adalah air yang digunakan untuk pencegahan dan pengobatan penyakit. Air alkali disebut pula dengan *Electrochemically Reduced Water (ERW)*, *Alkaline Electrolyzed water*, *Alkali-Ionic Water*, *Alkaline Cathodic Water* dan *Alkaline Ionized Water*. Selain itu, air alkali disebut pula sebagai *kangen water*, *hexagonal water*, *spawater*, *microwater*, *ionized water* dan *living water* (Shirahata *et al.*, 2007). Tahapan pertama proses elektrolisis yaitu air akan difiltrasi dengan menggunakan karbon aktif yang merupakan sebuah material atau bahan yang memiliki pori-pori sangat banyak dan luas. Pori-pori ini berfungsi untuk menyerap setiap kontaminan yang melaluinya. Artinya, jika air disaring dengan karbon aktif, maka kontaminan dalam air dapat masuk dalam pori-pori dan terjebak di dalamnya serta dapat menjernihkan air yang keruh, menghilangkan bau dari air tersebut dan mengurangi tingkat klorida sehingga menghindari kerusakan pada sel elektrolit. Selanjutnya, air akan dimasukkan dalam filter keramik yang memiliki pori-pori keramik dengan otomatis menyaring air tersebut hingga steril dari bakteri. Pori-pori yang dibentuk oleh sekam itu berukuran 0,2-3 nanometer dan berlapis perak sehingga mematikan bakteri di dalamnya. Air yang sudah disaring akan masuk kedalam *electrolysis chamber* yang didalamnya sudah ada elektroda katoda dan anoda yang dipisahkan oleh semi-permeabel diafragma terbuat dari plastik. Elektroda yang digunakan

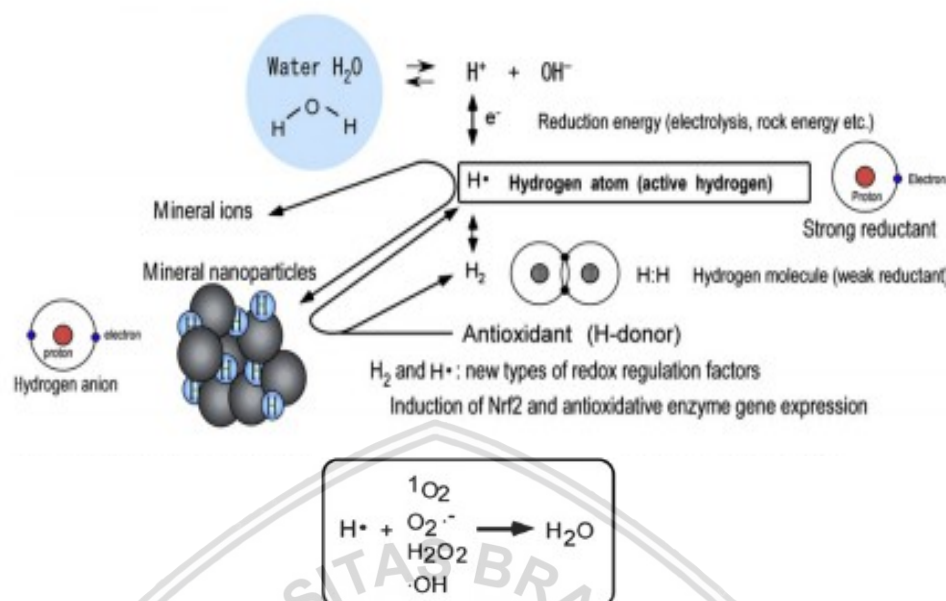
merupakan platinum berlapiskan titanium kemudian terjadilah proses elektrolisis yaitu pemecahan molekul air :



**Gambar 2.4** Prinsip elektrolisis air (Shirahata *et al.*, 2012).

**Keterangan:** **A.** Secara elektrokimia air direduksi di sekitar katoda adalah air yang kaya dengan molekul hidrogen sedangkan air dioksidasi di sekitar anoda adalah air yang mengandung gas oksigen, gas klorida dan asam hipoklorit. **B.** Terjadi reaksi pada permukaan elektroda platinum. Proton yang lepas dari air direduksi menjadi atom H teradsorpsi ( $\text{H}_{\text{ad}}$ ) pada permukaan pelat platinum kemudian  $\text{H}_{\text{ad}}$  diubah menjadi atom  $\text{H}_2$ .  $\text{H}_{\text{ad}}$  diserap ke dalam logam Pt untuk menghasilkan H teradsorpsi ( $\text{H}_{\text{ab}}$ ). Ion mineral dalam *original water* direduksi menjadi atom logam dan kemudian terorganisir membentuk mineral nanopartikel. Mineral nanopartikel dilindungi oleh pelindung organik yang stabil dan tersebar di dalam air untuk waktu yang lama. Mineral nanopartikel *adsorb* atau atom H teradsorpsi dengan adanya  $\text{H}_2^-$  atau H-donor.

Elektrolisis air menghasilkan keadaan pereduksi yang kuat di sekitar katoda, karena sebagian besar tegangan diterapkan pada lapisan air di dekat katoda, membentuk medan listrik yang sangat tinggi. Mineral nanopartikel dan mineral nanopartikel hidrida juga terbentuk. Nanopartikel yang dihasilkan mengaktifkan atom hidrogen (Hamasaki *et al.*, 2008; Kajita *et al.*, 2007).



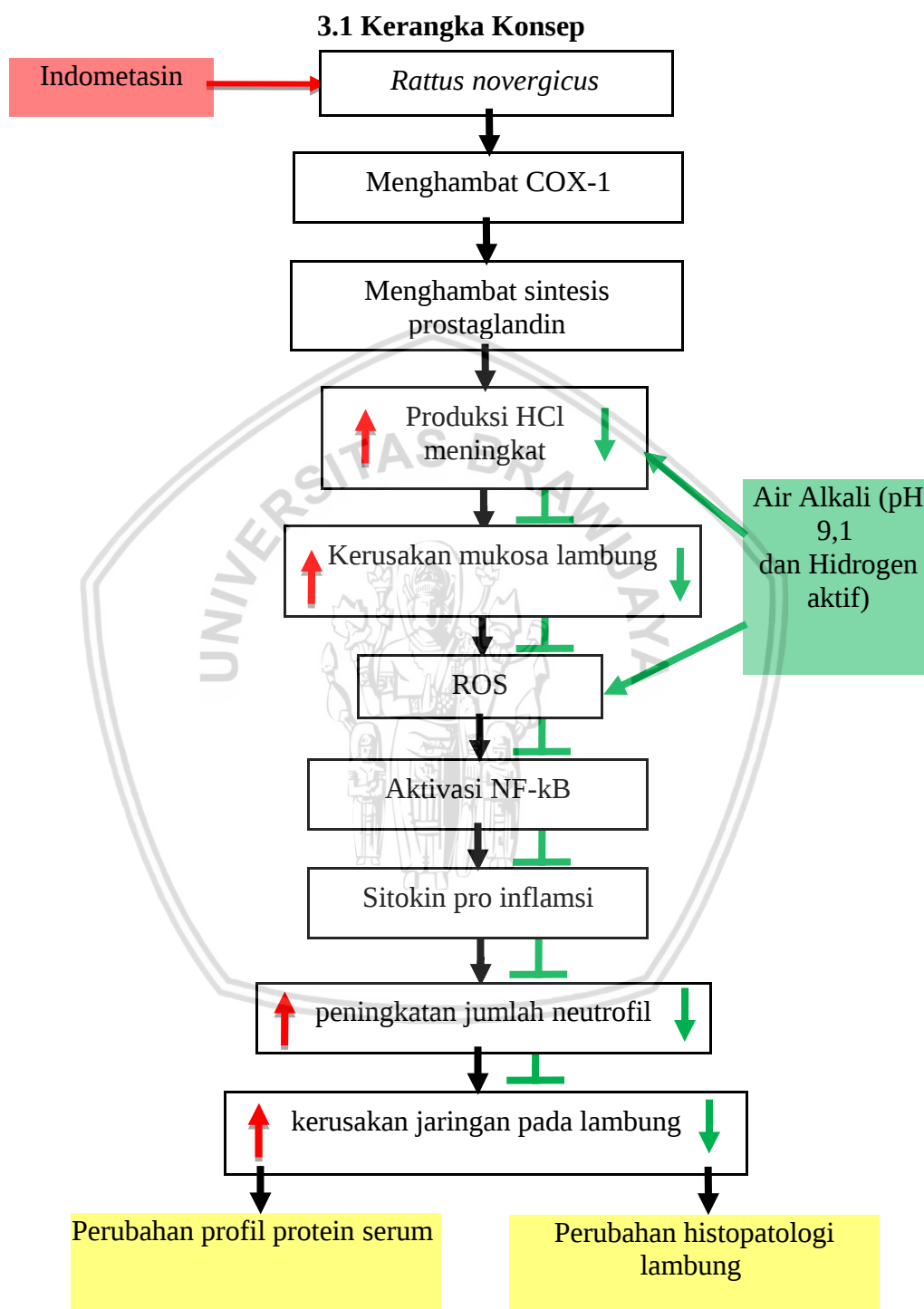
**Gambar 2.5** Proses Hidrogen Aktif dalam Air Alkali (Shirahata *et al.*, 2012).

Air direduksi dengan energi listrik dan energi lainnya untuk menghasilkan hidrogen aktif (H atom) dan mineral nanopartikel. Atom H menghasilkan molekul hidrogen,  $H_2$  berfungsi sebagai H-donor. Mineral nanopartikel dapat mempertahankan *reduction energy*, karena nanopartikel secara bertahap memisahkan ion mineral, dan melepaskan elektron. Mineral nanopartikel merangsang atom H merilis berbagai zat organik seperti antioksidan dan metanol untuk meningkatkan *reducibility*. Mineral nanopartikel hibrida dapat melepaskan anion hidrogen, yang dapat berfungsi sebagai reduktan. Molekul hidrogen dan hidrogen aktif merupakan faktor regulasi redoks yang dapat menginduksi ekspresi enzim antioksidan. Enzim antioksidan adalah jalur utama pertahanan terhadap radikal bebas pada sel hewan dan tumbuhan (Shirahata *et al.*, 2012).



Air alkali memiliki fungsi utama sebagai antioksidan karena memiliki kandungan hidrogen yang tinggi. Air alkali atau air basa berfungsi sebagai penyeimbang kelebihan asam dalam tubuh. Air alkali merupakan air yang mengandung beberapa komponen tertentu seperti pH diatas 7 (pH 9.1), molekul air mikro kluster, nilai *Oxidation Reductional Product* (ORP) negatif dan hidrogen sangat tinggi sebagai antioksidan. Semakin negatif nilai ORP suatu cairan maka semakin besar potensi dalam menyumbangkan elektron ke sel-sel yang kehilangan elektron akibat diambil oleh radikal bebas. Air alkali tidak hanya memiliki pH tinggi dan nilai *Oxidation Reductional Product* (ORP) negatif, tetapi juga mengandung ion magnesium dan kalsium yang mampu mencegah penyakit dan menetralkan keadaan tubuh yang asam (Vorobjova, 2005). Air alkali bekerja dengan mempengaruhi sistem imun, bertindak pada respon imun lokal mempengaruhi penurunan ekspresi sitokin pro-inflamasi (Kim dan Yokoyama, 1997; Watanabe *et al*, 1997).

## BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN



**Gambar 3.1** Kerangka Konseptual






Keterangan gambar:

 : Pemberian indometasin

 : Terapi air alkali

 : Variabel yang diamati

 : Efek pemberian indometasin  
 : Efek terapi air alkali  
 : Menghambat

*Inflammatory Bowel Disease* (IBD) merupakan penyakit inflamasi pada saluran gastrointestinal yang ditandai dengan peradangan dan infiltrasi seluler pada mukosa lambung, usus halus dan usus besar yang diawali dengan masuknya agen kausatif ke dalam tubuh melalui saluran pencernaan. Agen kausatif yang digunakan berupa indometasin. Indometasin dapat meningkatkan produksi Reactive Oxygen Species (ROS), radikal  $O_2 \cdot^-$ ,  $OH \cdot$  dan  $H_2O_2$  (Takeuchi *et al.*, 2003). Indometasin merupakan salah satu obat golongan NSAID penyebab IBD karena mekanisme kerja indometasin dapat menghambat siklooygenase-1 (COX-1) dan siklooxygenase-2 (COX-2) yang mana hambatan pada COX-1 dapat menurunkan produksi PGI<sub>2</sub> dan hambatan pada COX-2 dapat menurunkan produksi PGE<sub>2</sub>, selain itu hambatan pada COX-1 dapat meningkatkan regulasi dari COX-2. Hal tersebut menyebabkan terjadinya peningkatan sekresi HCL pada lambung, penurunan aliran darah mukosa lambung dan penurunan sekresi mucus yang dapat memicu aktifitas makrofag dalam memfagositosis sel debris dari sel nekrosis dan menginduksi keluarnya sitokin proinflamasi (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  dan IL-6) yang kemudian merangsang mediator inflamasi dan peningkatan produksi *Reactive Oxide Species* (ROS).

Peningkatan ROS akan menimbulkan stress oksidatif, selanjutnya stress oksidatif akan menyebabkan terganggunya fungsi sel lambung. Kerusakan jaringan pada lambung mengakibatkan meningkatnya CRP (*C-Reactive Protein*) didalam aliran darah. Saat terjadi inflamasi pada jaringan level CRP meningkat dan ketika inflamasi sudah teratasi level CRP menurun, membuat protein ini sangat berguna sebagai marker dari aktivitas suatu penyakit (WHO, 2014). Disisi lain kerusakan jaringan lambung juga dapat dilihat melalui pengamatan histopatologi.

Hewan model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) diterapi dengan air alkali yang memiliki pH diatas 7 yang dapat menyeimbangkan asam lambung akibat penurunan sekresi mukus dan bikarbonat, molekul air mikro kluster sehingga mudah diserap oleh tubuh, nilai ORP negatif di mana semakin negatif nilai ORP suatu cairan maka semakin besar pula ia menyumbangkan elektron ke se-sel yang kehilangan elektron akibat dicuri atau diambil oleh radikal bebas, serta memiliki kandungan antioksidan tinggi yang diperoleh dari proses elektrolisis air yang menghasilkan molekul hidrogen aktif sebagai reduktor kuat, yang berfungsi sebagai H-donor. Kandungan hidrogen terlarut yang sangat tinggi dalam air alkali yang berperan sebagai antioksidan dengan menyumbangkan elektronnya pada sel yang kehilangan elektron akibat diambil oleh radikal bebas, sehingga diharapkan dapat menetralkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Shirahata *et al.*, 2012). Penetralkan ROS akan menimbulkan turunnya stress oksidatif, selanjutnya turunnya stress oksidatif akan mengembalikan fungsi sel lambung. Perbaikan jaringan pada lambung

mengakibatkan menurunnya CRP (*C-Reactive Protein*) didalam aliran darah. Perbaikan jaringan lambung juga dapat dilihat melalui pengamatan histopatologi. Reactive Oxygen Species (ROS) dapat dinetralkan dengan pemberian air alkali karena air alkali memiliki kandungan hidrogen terlarut sangat tinggi yang berperan sebagai antioksidan. Dengan menurunnya ROS maka proses radikal yang dapat merusak jaringan lambung dapat dikurangi. Mekanisme ini akan memberikan efek perbaikan terhadap jaringan yang rusak akibat indometasin yang menyebabkan stres oksidatif dan kemudian akan terjadi perubahan pada profil protein serum dan perubahan pada histopatologi lambung.

### 3.1 Hipotesa Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah dipaparkan, maka dapat disusun hipotesis sebagai berikut :

1. Terapi air alkali dapat memperbaiki kerusakan histopatologi lambung tikus (*Rattus norvegicus*) *Inflammatory Bowel Disease*.
2. Terdapat perbedaan profil protein serum tikus (*Rattus norvegicus*) sehat, hasil induksi Indometasin dan tikus IBD yang mendapat terapi air alkali.

## BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biosains. Pengujian penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia, Fakultas MIPA, sedangkan pembuatan histopatologi dilakukan di laboratorium patologi anatomi, fakultas kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang. Penelitian dilaksanakan selama bulan Januari 2016 sampai dengan Mei 2016.

### 4.2 Materi Penelitian

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar, jantan, berumur 8-12 minggu. Pemeliharaan hewan coba dilakukan di dalam kandang berupa bak plastik dengan tutup kawat beralas sekam yang ditempatkan di Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya Malang. Setiap pagi diberi pakan ransum dan minum secara *adlibitum*.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain tabung reaksi, alat bedah (gunting tajam-tajam, gunting tajam-tumpul, pinset, scalpel, blade), sonde lambung, labu takar (100 mL, 500 mL, dan 1.000 mL), gelas ukur 500 mL, pipet tetes, pengaduk kaca, mortar, alumunium foil, tabung *microtube*, rak tabung reaksi, mikropipet (10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, dan 1.000  $\mu$ L), penangas air, *waterbath*, lemari pendingin, seperangkat alat sentrifugasi,

vortex, timbangan digital, spektrofotometri, stirer, plastik klip, blue tip, yellow tip, glove, autoclave, spuit, shaker, dan sonikator.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus novergicus*), indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB tikus, air alkali yang diperoleh dari pabrik yang ada di Jawa Timur, minyak jagung, aquades steril, PBS-azida, NaCl Fisiologis 0,9%, PBS-Tween:PMSF, etanol absolut, 0,02 M Tris-HCl pH 6,5, kasein 500 ppm, larutan buffer fosfat pH 7, TCA 4%.

#### 4.3. Sampel Penelitian

Sampel penelitian berupa hewan coba tikus wistar (*Rattus novergicus*) jantan yang berusia 8-12 minggu dengan berat badan 150-200 gram, kondisi sehat (berambut cerah, aktivitas baik, tidak ada abnormalitas anatomis, dan nafsu makan baik), lulus proses sertifikasi layak etik penelitian oleh KEP dan belum pernah digunakan penelitian. Hewan coba diaklimatisasi selama 7 hari yang ditempatkan di laboratorium Biosains Universitas Brawijaya Malang. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus  $p(n-1) \geq 15$  (Kusriningrum, 2008).

$$p(n-1) \geq 15$$

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \geq 5$$

Keterangan :

p = jumlah kelompok

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka diperoleh 4 kelompok perlakuan dengan 5 kali ulangan dalam setiap kelompok. Total tikus yang dibutuhkan adalah 20. Selanjutnya dibagi dalam 4 kelompok yaitu kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan 1, perlakuan 2.

#### 4.4 Rancangan Penelitian

Pemberian air alkali dan indometasin diberikan peroral (Tabel 4.1).

Tatalaksana induksi tikus model IBD dan terapi sebagai berikut :

**Tabel 4.1** Tatalaksana Penelitian

Hari ke	Perlakuan
1	Persiapan 20 ekor tikus dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok A (kontrol negatif), kelompok B (kontrol positif / IBD), kelompok C (terapi 1 mL) dan kelompok D (terapi 2 mL). Semua tikus diadaptasi selama 7 hari
8	Penginduksian indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB pada kelompok B, C dan D
9	Pembedahan pada kelompok B dan pengkoleksian organ lambung dan serum darah, serta pemberian terapi air alkali pada kelompok C dan D selama 7 hari
16	Pembedahan pada kelompok A, C dan D dan pengkoleksian organ lambung dan serum darah.

#### 4.5 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : Induksi indometasin 15 mg/kg BB dan terapi air alkali.

Variabel tergantung : Profil protein serum dan histopatologi lambung.

Variabel kontrol : Tikus strain Wistar jantan berumur 8-12 minggu dengan berat antara 150 – 200 gram.

#### 4.6 Tahapan Penelitian

##### 4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Tikus diadaptasikan terhadap lingkungan kandang selama tujuh hari. Tikus dibagi dalam empat kelompok perlakuan. Setiap kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Perawatan hewan coba dilakukan dengan mengelompokkan tikus dalam empat kotak plastik berbentuk persegi panjang dengan ukuran 30 x 50 x 12 cm yang diberikan alas berupa sekam serbuk kayu, tempat minum (*nipple*) yang berisi air mineral dan pakan dengan pakan standar *BR2 (Comfeed)*.

Kandang tikus berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri serta polutan lainnya. Lantai kandang mudah dibersihkan dan disanitasi. Suhu optimum ruangan untuk tikus adalah 22-24°C dan kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup (namun tidak ada jendela terbuka) (AOAC, 2005).



#### 4.6.2 Persiapan Indometasin

Pemberian indometasin menggunakan metode sonde oral. Dosis indometasin yang digunakan adalah 15 mg/kg BB tikus (Aulanni'am dkk., 2012). Berat rata-rata tikus yang digunakan  $\pm 180$  gram dan terdapat 15 ekor yang akan diinduksi indometasin, jadi indometasin yang diperlukan untuk setiap tikus adalah

$$\frac{180 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}} \times 15 \text{ mg/kg BB} = 2,7 \text{ mg/tikus}$$

Untuk membuat larutan stok, setiap 45 mg indometasin akan dilarutkan ke dalam 4 mL pelarut minyak jagung (Bures *et al.*, 2011). Banyaknya larutan yang diperlukan untuk pemberian per oral adalah :

$$\frac{2,7 \text{ mg}}{45 \text{ mg}} \times 4 \text{ ml} = 0,24 \text{ ml/tikus}$$

#### 4.6.3 Persiapan Air Alkali

Dosis pemberian air alkali yaitu 1 mL dan 2 mL yang diberikan sehari dua kali yaitu pagi dan sore. Masing – masing dosis terapi terdapat 5 ekor tikus. Pemberian air alkali dilakukan dengan cara sonde lambung. Air alkali diperoleh dari salah satu pabrik yang terdapat di Jawa Timur.

#### 4.6.4 Pengambilan Organ Lambung

Organ lambung diambil pada hewan coba tikus putih (*Ratus norvergicus*) jantan dilakukan setelah pemberian terapi air alkali selama tujuh hari. Sebelumnya dipersiapkan terlebih dahulu tempat untuk bedah, dan peralatan bedah meliputi pinset anatomis, dan gunting. Hewan coba dieuthanasi dengan cara dislokasi leher, posisikan tikus pada papan bedah menggunakan pin dengan posisi rebah dorsal. Bedah mulai organ abdomen

kemudian diambil organ-organnya salah satunya yaitu lambung. Kemudian organ dicuci dalam NaCl fisiologis 0,9%, lalu dimasukkan kedalam botol film yang di dalamnya sudah diberikan larutan PFA untuk pembuatan histopatologi (Pratiwi dkk., 2013).

#### 4.6.5 Isolasi Serum

Pengambilan darah di tikus diambil melalui jantung tikus. Darah diambil sebanyak 5 ml diletakkan pada microtube kemudian didiamkan pada suhu ruang atau diinkubasi dalam inkubator bersuhu 37°C selama 30-60 menit. Dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan (serum) diambil menggunakan mikropipet dipimicrotubndahkan ke microtube baru dan serum siap untuk digunakan, untuk penggunaan jangka lama disimpan pada suhu - 20°C (Fatchiyah *et al.*, 2013).

Serum darah 200 ml dalam microtube ditambahkan PBST-PMSF sebanyak 5 kali volume. Divortex hingga homogen. Homogenat disonikasi selama 10 menit, dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit. Supernatan diambil kemudian ditambahkan etanol absolut dingin dengan perbandingan 1 : 1. Didiamkan selama 24jam. Dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit. Etanol dibuang, kemudian dikering anginkan dan ditambah dengan larutan Tris-Cl 1 : 1. Sampel disimpan dalam lemari pendingin pada suhu - 20oC (Fatchiyah *et al.*, 2011).

#### 4.6.6 Pembuatan Preparat Histopatologi

##### 4.6.6.1 Fiksasi

Fiksasi dilakukan dengan cara memotong organ lambung, organ yang sudah dipotong dibilas menggunakan NaCl fisiologis 0,9% dan dibersihkan dari kotoran lalu dimasukkan kedalam larutan paraformaldehyde 4% (PFA 4%). Tujuan fiksasi yakni mencegah terjadinya kerusakan jaringan, menghentikan proses metabolisme dan menjaga keawetan jaringan yang akan digunakan sebagai preparat histologis.

##### 4.6.6.2 Dehidrasi

Dalam proses dehidrasi digunakan alkohol bertingkat yakni 70% (24 jam), 80% (2 jam), 90% (20 menit) dan 95% (20 menit). Dipindah ke alkohol absolut I, II dan II selama masing-masing 20 menit. Proses dehidrasi bertujuan untuk mengeluarkan air sebanyak-banyaknya dari dalam jaringan.

##### 4.6.6.3 Penjernihan (*Clearing*)

Proses penjernihan (*Clearing*) menggunakan reagen *xylol*, dilakukan dengan cara memindahkan jaringan dari alkohol absolut III ke larutan penjernih (*xylol*). Larutan penjernih (*xylol*) yang digunakan yakni *xylol* I (20 menit), *xylol* II (30 menit) pada suhu 60°C. Penjernihan (*clearing*) bertujuan untuk menggantikan tempat etanol dalam jaringan.

#### 4.6.6.4 Infiltrasi Parafin

Infiltrasi parafin bertujuan untuk menggantikan tempat dehidran dalam jaringan dan bahan penjernih dengan parafin cair. Infiltrasi parafin dilakukan dengan cara merendam jaringan dalam parafin cair I, parafin cair II, dan parafin cair III. Masing-masing perlakuan dilakukan selama 1 jam dalam inkubator suhu 58-60°C.

#### 4.6.6.5 Penanaman Jaringan (*Embedding*) dan *Sectioning*

Proses *Embedding* dilakukan dengan mencelupkan jaringan dalam paraffin cair yang telah dituang ke dalam cetakan berbentuk blok yang akan memadat. Selanjutnya, cetakan tersebut dipasang pada penjepit (*blok holder*) mikrotom dan diatur agar posisinya sejajar dengan posisinya sejajar dengan posisi pisau pemotong. Selanjutnya dilakukan pemotongan jaringan dimana pada awal pemotongan dilakukan trimming karena jaringan yang terpotong masih belum sempurna. Tiap blok parafin dipotong dengan ketebalan 4-5  $\mu\text{m}$ . Preparat disimpan pada inkubator dalam air hangat suhu 38-40°C selama semalaman dengan tujuan untuk membuka lipatan dan meluruskan kerutan halus yang ada. Irisan diletakkan pada objek glass dan dikeringkan di atas *hot plate* pada suhu 38-40°C sampai kering, kemudian disimpan dalam inkubator suhu 38-40°C dan siap dilakukan pewarnaan HE.

#### 4.6.7 Pewarnaan *Hematoksilin – Eosin*

Zat pewarna hematoksilin digunakan dalam proses pewarnaan preparat HE dengan tujuan untuk memberi warna biru pada inti sel (basofilik) sedangkan eosin yang merupakan *conterstaining* hematoksilin digunakan untuk mewarnai sitoplasma dan jaringan penyambung serta memberikan warna merah muda. Langkah awal yang dilakukan yakni deparafinasi menggunakan xylol I dan II selama masing-masing 5 menit, dilanjutkan dengan proses rehidrasi menggunakan alkohol absolut I, II dan III dengan kisaran waktu masing-masing 5 menit, alkohol bertingkat 95%, 90%, 80% dan 70% secara berurutan dalam waktu masing-masing 5 menit. Preparat kemudian dicuci dengan air mengalir selama 15 menit, lalu direndam dalam larutan aquades selama 5 menit. Dilakukan pewarnaan Hematoxylen selama 10 menit atau sampai didapat hasil terbaik. Setelah proses pewarnaan, dilakukan pencucian dengan air mengalir selama 15 menit serta direndam dalam aquades selama 5 menit. Proses pewarnaan dilanjutkan menggunakan pewarna eosin alkohol selama 5 menit lalu direndam dalam aquades selama 5 menit hingga preparat tidak mengalami kelebihan pewarna eosin. Selanjutnya, dilakukan proses dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat 80%, 90%, 95% selama beberapa detik saja dan segera direndam pada alkohol absolut I, II, dan III masing-masing selama 5 menit. Setelah itu, dilakukan *clearing* menggunakan xylol I, II selama 5 menit. Langkah terakhir yakni perlakuan *mounting* menggunakan larutan *entellan* dan ditutup dengan *cover glass*.

Preparat lambung yang sudah siap lalu diamati menggunakan mikroskop cahaya (*Olympus BX51*) dengan perbesaran 400x. Adapun bagian yang perlu diamati yakni adanya perubahan pada mukosa lambung terutama edema lamina propria dan erosi epitel serta infiltrasi sel radang pada lambung tikus (*Rattus norvegicus*) *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) serta adanya perbaikan histopatologi lambung berupa regenerasi epitel setelah dilakukan terapi.

#### **4.6.8 Pengamatan Histopatologi**

Pengamatan histopatologi lambung dilakukan menggunakan mikroskop cahaya (*Olympus BX-51*) dengan perbesaran 400x. pengamatan histopatologi lambung meliputi perubahan histologi pada lapisan mukosa, adanya edema, dan kerusakan epitel.

#### **4.6.9 Elektroforesis SDS-PAGE**

##### **4.6.9.1 Persiapan Gel**

Pada persiapan gel, langkah pertama plat gel dibuat dengan merangkai dua plat kaca dengan jarak antar plat kurang lebih 1 mm. Gel dibuat dua lapis yaitu gel sebagai tempat sampel (*Stacking gel*) dan gel sebagai media untuk pemisahan protein (*Sparating gel*). *Sparating gel* dibuat dari Lower Gel Buffer (LGB), T-Acryl, dd H<sub>2</sub>O, ammonium persulphate (APS), N, N, N', N', - tetramethyl ethylene diamine (TEMED) yang dilarutkan menjadi satu dalam akuades steril.

Dituangkan secara hati-hati ke dalam tempat lapisan gel menggunakan mikropipet dan dibiarkan 10-30 menit hingga terbentuk gel. Berikutnya Stacking gel dituang di atas separating gel yang telah memadat sambil dipasang sisir hingga terbentuk gel berikut sumurannya. Stacking gel dibuat dari UpperBuffer, T-Acryl, APS, TEMED dan dilarutkan menjadi satu dalam akuades steril. Setelah terbentuk gel, sisir diangkat dengan hati-hati dan plate dipasang pada alat elektroforesis, dan dituangkan larutan running buffer pada bejana elektroforesis.

#### 4.6.9.2 Injeksi Sampel dan Running

Isolasi serum diambil 150  $\mu$ l, ditambahkan 150  $\mu$ l *Reducing Sample Buffer* (RSB), dan dipanaskan pada penangas air dengan temperatur 100°C selama lima menit. Setelah didinginkan sampel dimasukkan dalam sumur-sumur gel dengan volume 20  $\mu$ l untuk tiap sumuran, dimana salah satu sumuran gel diisi dengan protein standar marker. Selanjutnya, anoda dihubungkan pada reservoir bawah dan katoda dihubungkan pada reservoir atas dan dihubungkan *power supply* dengan arus listrik sebesar 200 V. Dihentikan proses ini jika warna penanda biru berada kurang lebih 0,5 cm dari batas bawah plat gel.

#### 4.6.9.3 Perlakuan Setelah Running

Perwarnaan dilakukan dengan merendam gel dalam larutan staining selama 30-60 menit dengan dikocok menggunakan shaker. Pewarna yang digunakan yaitu *Commasie Brilliant Blue*. Menghilangkan warna dilakukan



dengan merendam gel dalam larutan destaining sambil dikocok menggunakan shaker sampai gel menjadi jernih.

#### 4.6.9.4 Penentuan Berat Molekul

Dengan membandingkan hasil elektroforesis sampel dengan marker protein maka dapat diketahui jenis-jenis protein dalam ekstrak kasar enzim tersebut. Penentuan berat molekul dilakukan dengan menghitung nilai Rf (Retardation factor) dari masing-masing pita dimana:

$$R_f = \frac{\text{jarak pergerakan protein dari tempat awal (cm)}}{\text{jarak pergerakan warna dari tempat awal (cm)}}$$

Kemudian dibuat kurva standar dengan harga Rf sebagai sumbu X dan harga logaritma berat molekul sebagai sumbu Y, kemudian diplotkan mobilitas dan berat molekul dari protein yang akan dicari sehingga diketahui berat molekulnya.

#### 4.7 Analisa Data

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini diamati dari gambaran histopatologi pada lambung dan perbedaan profil protein pada serum. Analisa data yang digunakan berupa gambaran histopatologi lambung yang dianalisis dan disajikan secara deskriptif dan data semi-kuantitatif untuk mengetahui perbedaan profil protein serum tikus yang akan dianalisis dan disajikan dari masing-masing kelompok perlakuan.

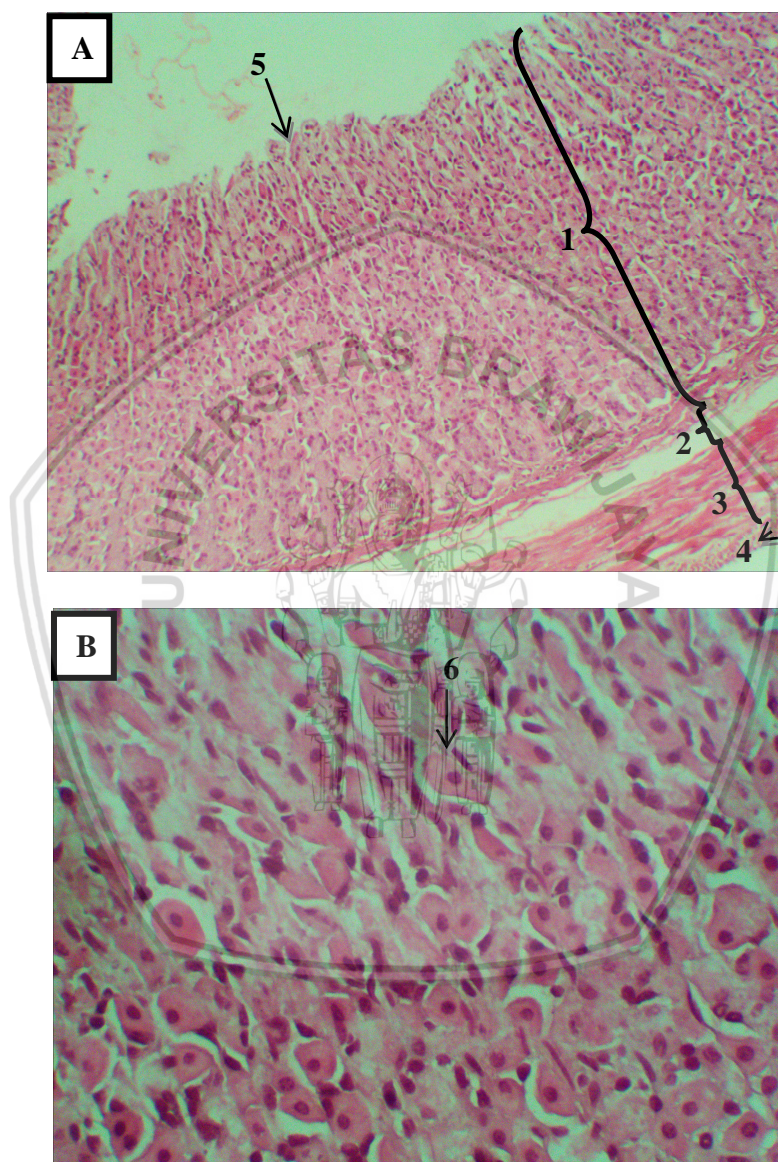
## BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini mengamati histopatologi pada organ lambung dan profil protein serum tikus putih yang diinduksi dengan indometasin. Tikus putih yang diinduksi dengan indometasin menunjukkan gejala berupa anoreksia, diare dan penurunan berat badan. Hasil nekropsi dari hewan model menunjukkan adanya kerusakan berupa lesi pada organ pencernaan yang mana hal ini adalah tanda terjadinya IBD. Identifikasi gambaran histopatologi preparat lambung menggunakan pewarnaan *hematoxylin-eosin* (HE) untuk mengetahui gambaran kerusakan yang terjadi pada histologi lambung tikus putih melalui hasil pewarnaan yang terbentuk.. Pengamatan profil protein serum menggunakan metode SDS PAGE yang akan menentukan berat molekul protein. Protein yang diamati yakni CRP yang mana protein tersebut merupakan sebuah *biomarker* terjadinya peradangan pada jaringan.

### 5.1 Studi Pengaruh Terapi Air Alkali Terhadap Gambaran Histopatologi Lambung Tikus (*Rattus Norvegicus*) Model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) Hasil Induksi Indometasin

Pada penelitian ini indikator keberhasilan pemberian terapi air alkali pada *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) dapat diketahui melalui pengamatan histopatologi lambung dengan pewarnaan *Hematoksilin Eosin* (HE) yang berfungsi sebagai salah satu penentu keberhasilan terapi. Pengamatan dilakukan dengan membandingkan antar kelompok perlakuan (**Gambar 5.1**) dan dianalisis secara deskriptif. Penelitian ini menggunakan perbesaran 400x dengan mengamati perubahan pada mukosa lambung terutama adanya edema

lamina propria dan erosi epitel. Hasil pengamatan terhadap gambaran histopatologi lambung tikus pada masing-masing kelompok perlakuan disajikan pada **Gambar 5.1**.

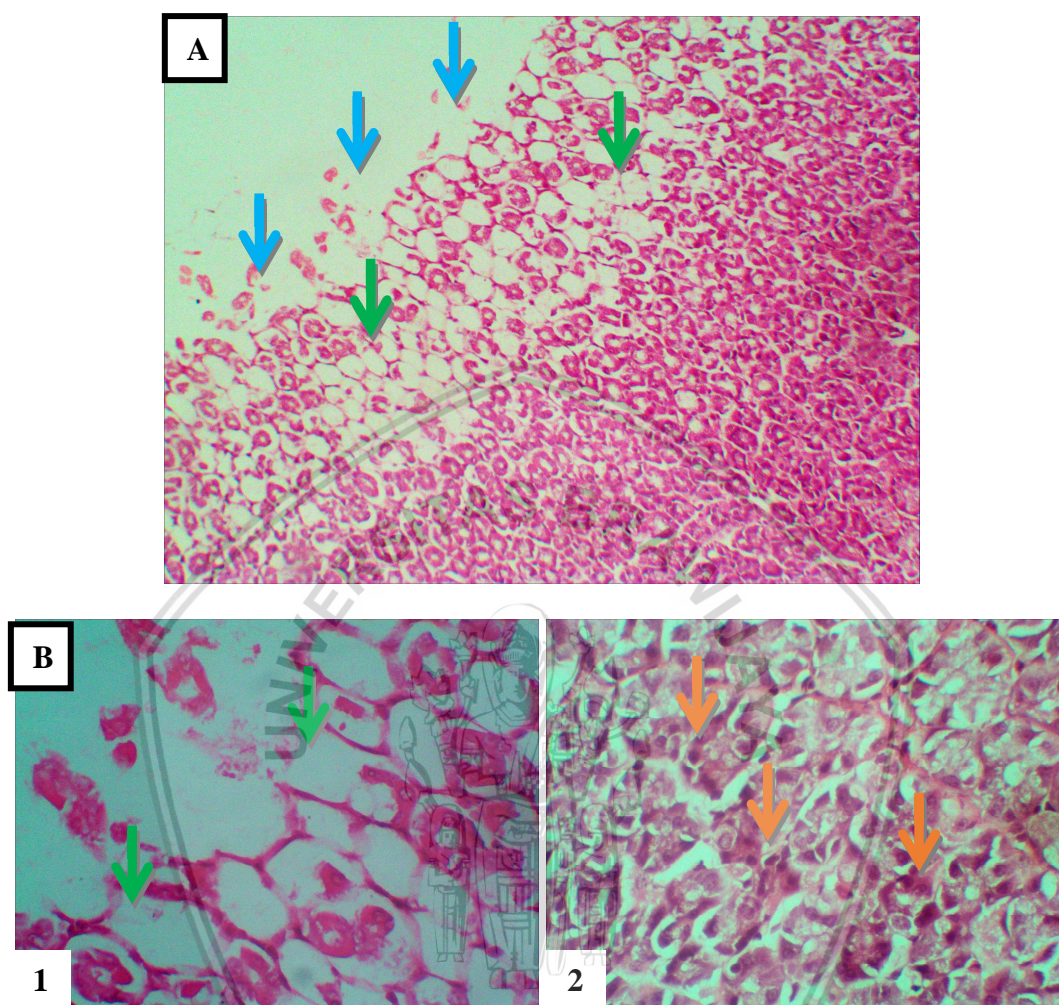


**Gambar 5.1.** Gambaran Histologi lambung tikus sehat (kontrol negatif) dengan pewarnaan HE.

**Keterangan :** (A) Perbesaran 100x; (1) tunika mukosa, (2) tunika submukosa, (3) tunika muskularis eksterna, (4) tunika serosa, (5) *gastric pit* (B) Perbesaran 400x; ( 6 ) Sel Parietal.

Histopatologi dari kelompok kontrol negatif (**Gambar 5.1**) menunjukkan gambaran histologi lambung dengan ciri-ciri yang sesuai dengan lambung normal. Histologi lambung secara umum dibagi menjadi lapisan mukosa, submukosa, muskularis, dan serosa. Lapisan mukosa lambung sendiri tersusun oleh epitel silindris yang melekat pada lapisan lamina propia dan memiliki sumuran yang disebut rugae. Semakin kebawah saluran lambung, rugae yang terbentuk juga akan semakin banyak dan berlapis. Mukosa pada lambung memiliki 3 bagian terpisah pada bagian kelenjar, diantaranya bagian isthmus, leher (*neck*), dan bagian basal (Puspitasari, 2008). Pada bagian isthmus kelenjar lambung terdiri tersusun oleh sel parietal dan sel epitel. Bagian leher hingga basal kelenjar lambung tersusun atas sel *chief* yang biasa disebut dengan *peptic cell* dimana *peptic cell* ini memiliki salah satu fungsi utama dalam pembentukan enzim pepsin pada lambung (Puspitasari, 2008). Gambaran tersebut dapat digunakan sebagai acuan untuk melihat kondisi histopatologi pada kelompok tikus IBD, kelompok terapi 1 mL/ ekor dan kelompok terapi 2 mL/ ekor. Pemberian indometasin sebesar 15 mg/kg BB per oral yang diinkubasi selama 24 jam dapat menginduksi ulserasi pada mukosa, edema dan perdarahan sehingga menyebabkan IBD (Krieglstein *et al.*, 2001). Indometasin bekerja dengan menghambat COX-1 yang mengakibatkan penurunan sintesa prostaglandin dan penurunan produksi mukus sehingga tidak ada perlindungan terhadap barrier mukosa (Takeuchi *et al.*, 2003).





**Gambar 5.2.** Gambaran Histopatologi lambung tikus (*Rattus norvegicus*) *Inflammatory Bowel Disease* (Kontrol positif) dengan pewarnaan HE.

**Keterangan :** (A) Perbesaran 100x; (↓) Erosi sel epitel mukosa lambung, (↓) Edema (B) Perbesaran 400x; (↓) Edema, (↓) Infiltrasi sel radang.

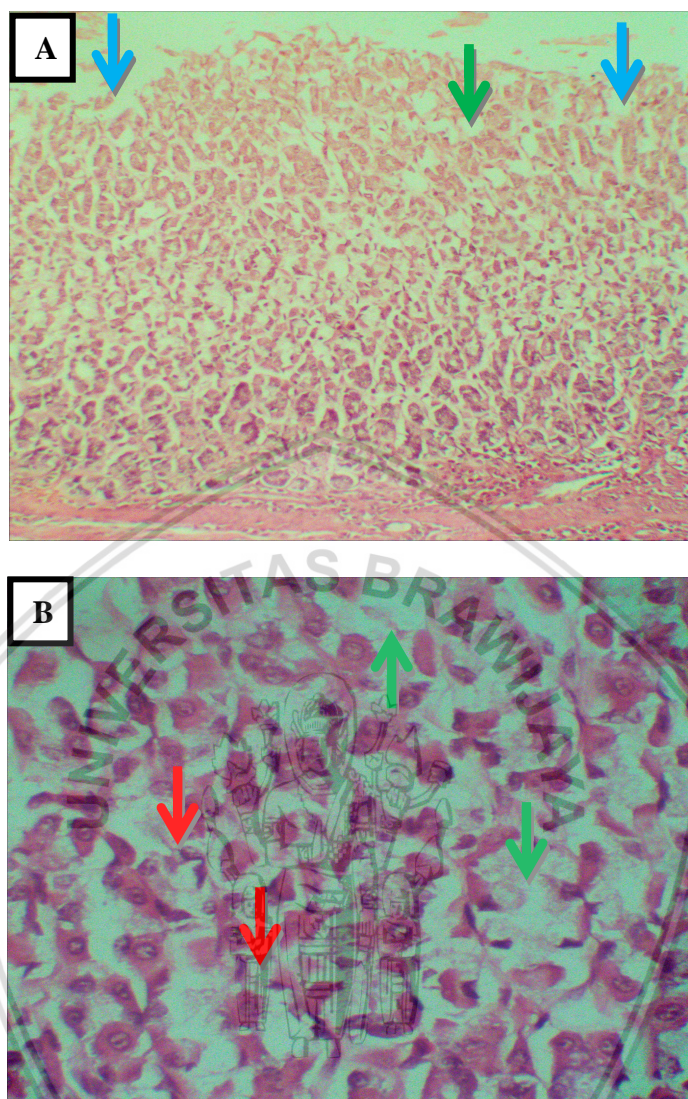
Gambaran histopatologi kelompok kontrol positif (**Gambar 5.2**) menunjukkan terjadinya peradangan akut yaitu terlihat adanya erosi pada sel-sel epitel dan adanya edema. Ketika terjadi peradangan pada jaringan, leukosit akan bermigrasi langsung pada tempat yang mengalami injury dan membersihkan agen yang menginvasi. Pada mekanisme ini, terjadi perubahan

vaskular yaitu vasodilatasi pembuluh darah sehingga terjadi peningkatan permeabilitas vaskular. Perubahan vaskular ini menyebabkan air dan ion mengalir ke dalam jaringan ekstrasvaskular dan terjadi akumulasi cairan atau edema (Kumar *et al.*, 2007).

Kerusakan struktur sel-sel pada lapisan mukosa ini disebabkan karena mekanisme kerja indometasin menghambat siklooygenase-1 (COX-1) yang mana hambatan pada COX-1 dapat menurunkan produksi PGI<sub>2</sub>, selain itu hambatan pada COX-1 dapat meningkatkan regulasi dari COX-2. Hal tersebut menyebabkan terjadinya peningkatan sekresi HCL pada lambung, penurunan aliran darah mukosa lambung dan penurunan sekresi mucus yang dapat memicu aktifitas makrofag yang kemudian merangsang mediator inflamasi dan peningkatan produksi *Reactive Oxide Species* (ROS).

Peningkatan ROS akan menimbulkan stress oksidatif, selanjutnya stress oksidatif akan menyebabkan terganggunya fungsi sel lambung. Kerusakan struktur sel-sel pada lapisan mukosa ini disebabkan karena struktur lipid atau PUFA pada sel kehilangan integritasnya sehingga terjadi peningkatan angka peroksidasi lipid. Inflamasi merupakan respon jaringan protektif terhadap kerusakan jaringan, yang bertujuan untuk menghancurkan, mengurangi jaringan nekrotik (Dorland, 2002). Respon inflamasi bertujuan untuk mempersiapkan jaringan untuk proses penyembuhan.





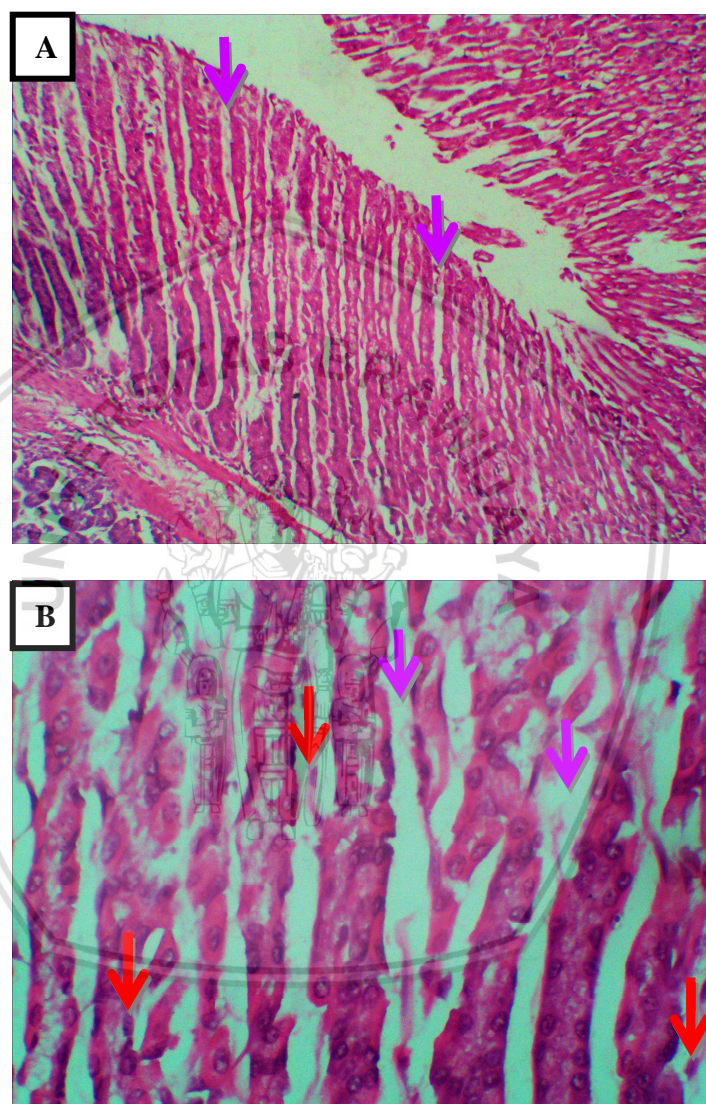
**Gambar 5.3.** Gambaran Histopatologi lambung tikus kelompok tikus terapi 1 (dosis 1 mL/ ekor) dengan pewarnaan HE

**Keterangan :** (A) Perbesaran 100x; (↓) Erosi sel epitel mukosa lambung, (↓) Edema  
(B) Perbesaran 400x; (↓) Edema, (↓) Regenerasi Sel.

Gambaran histopatologi kelompok tikus terapi 1 (dosis 1 mL/ ekor) (**Gambar 5.3**) menunjukkan adanya erosi pada sel-sel epitel atau belum terlihat adanya perbaikan sel-sel epitel lambung, masih menunjukkan adanya edema pada lapisan mukosa yang jumlahnya menurun dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Sedangkan pada gambaran histopatologi tikus kelompok terapi 2 (dosis 2 mL/ ekor) (**Gambar 5.4**) menunjukkan perbaikan



yang ditandai dengan adanya regenerasi sel-sel epitel (reepitelisasi) dan regenerasi sel parietal yang menyerupai dengan sel epitel lambung pada tikus kontrol negatif.



**Gambar 5.4.** Gambaran Histopatologi lambung tikus kelompok tikus terapi 2 (dosis 2 mL/ ekor) dengan pewarnaan HE.

**Keterangan :** (A) Perbesaran 100x; (↓) *gastric pit*. (B) Perbesaran 400x; (↓) *gastric pit*, (↓) Regenerasi Sel.

Pada gambaran histopatologi tikus kelompok terapi 2 (**Gambar 5.4**) tidak menunjukkan adanya edema dan vasodilatasi pembuluh darah. Perbaikan yang terjadi pada gambaran histopatologi organ lambung

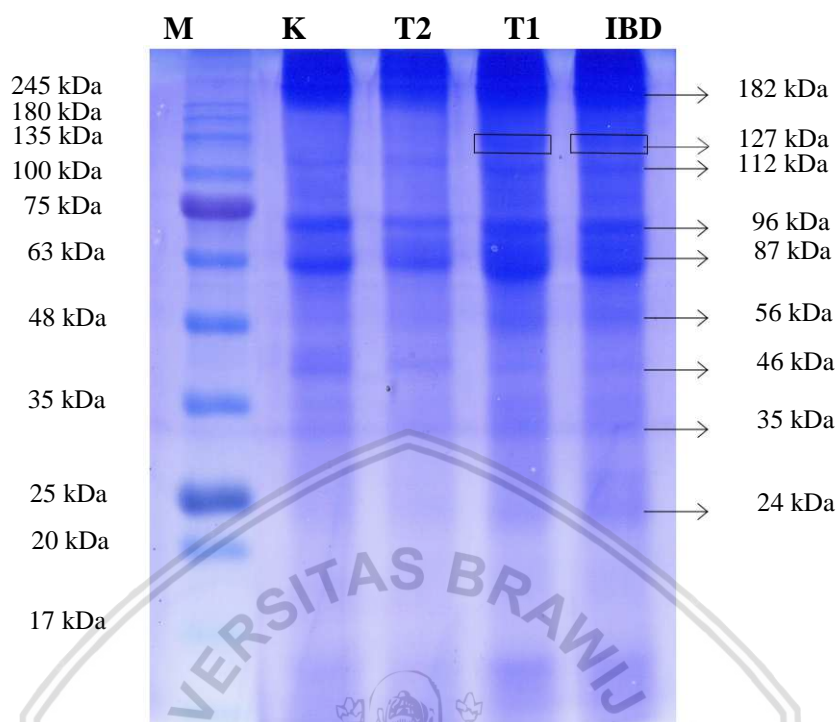
dikarenakan air alkali memiliki kandungan hidrogen terlarut sangat tinggi yang bertindak sebagai antioksidan. Terapi air alkali dengan dosis 2 mL/ ekor merupakan terapi yang paling efektif dalam menurunkan tingkat inflamasi yang disebabkan oleh IBD pada lambung.

Terapi dengan air alkali yang memiliki pH diatas 7 dapat menyeimbangkan asam lambung akibat penurunan sekresi mukus dan bikarbonat, molekul air mikro kluster sehingga mudah diserap oleh tubuh, nilai ORP negatif serta memiliki kandungan molekul hidrogen aktif sebagai reduktor kuat, yang berfungsi sebagai H-donor. Kandungan hidrogen terlarut yang sangat tinggi berperan sebagai antioksidan dengan menyumbangkan elektronnya pada sel yang kehilangan elektron akibat diambil oleh radikal bebas, sehingga dapat menetralkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Shirahata *et al.*, 2012) kemudian mempengaruhi penurunan ekspresi sitokin proinflamasi seperti TNF  $\alpha$ . TNF  $\alpha$  yang tidak teraktifasi maka dapat menghambat produksi neutrofil sehingga produksinya menurun (Tanaka *et al.*, 2013). Penghambatan pada produksi neutrofil dapat membantu dalam menurunkan kadar MDA dan dapat menurunkan tingkat kerusakan pada lambung melalui proses regenerasi sel. Regenerasi sel diperlukan oleh organ atau jaringan untuk memperbaiki sel yang mengalami kerusakan. Dengan menurunnya ROS maka proses radikal yang dapat merusak jaringan lambung dapat dikurangi. Mekanisme ini akan memberikan efek perbaikan terhadap jaringan yang rusak akibat indometasin. Proses perbaikan diawali dengan terjadi proses inflamasi. Jaringan yang mengalami inflamasi akan beradaptasi,

sehingga akan dapat kembali normal jika penyebab dari kerusakan tersebut dihilangkan. Jaringan yang mengalami kerusakan akibat paparan indometasin akan difagosit oleh makrofag dan neutrofil dengan tujuan untuk mengawali proses perbaikan jaringan.

## **5.2 Pengaruh Induksi Indometasin terhadap Profil Protein Serum Tikus (*Rattus norvegicus*)**

Pengaruh terapi air alkali terhadap gambaran Profil protein serum tikus (*Rattus norvegicus*) model *Inflammatory Bowel Disease* yang diinduksi indometasin dianalisa menggunakan metode *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Elektroforesis* (SDS-PAGE) adalah teknik untuk memisahkan rantai polipeptida pada protein berdasarkan kemampuannya untuk bergerak dalam arus listrik yang merupakan fungsi dari berat molekulnya. Pergerakan partikel protein di dalam media gel tergantung pada ukuran partikel dan ukuran media gel. Molekul yang lebih besar akan tertahan dan akibatnya bergerak lebih lambat (Wilson and Walker, 2000). Pada hasil penelitian ini profil protein hasil SDS-PAGE menunjukkan bahwa terdapat perbedaan antara profil protein serum tikus kontrol, tikus IBD dan setelah mendapatkan terapi air alkali selama satu minggu yang diberikan sehari dua kali dengan volume pemberian 1 mL/ekor dan 2 mL/ekor secara per oral.



**Gambar 5.5** Profil Pita Protein Lambung (SDS-PAGE 12%). Keterangan : (**M**) Marker, (**K**) Kontrol negatif (Sehat), (**IBD**) Sakit, (**T<sub>1</sub>**) Terapi 1 mL/ekor, (**T<sub>2</sub>**) Terapi 2 mL/ekor.

Berat molekul protein dapat ditentukan dengan kalibrasi menggunakan standar protein (marker) yang sudah diketahui berat molekulnya. Pengamatan dilakukan secara visual dengan melihat kolom-kolom pita protein dan dibandingkan antar perlakuan dengan kolom marker (Rahardjo dkk., 2007). Gambaran pita profil protein kondisi normal organ lambung tikus (**Gambar 5.5**) dapat digunakan sebagai acuan dalam membandingkan adanya kerusakan maupun perbaikan yang terjadi pada kelompok perlakuan lain. **Gambar 5.5** menunjukkan adanya perbedaan pita profil protein yang muncul pada masing – masing kelompok perlakuan tikus yang di jelaskan pada **Tabel 5.1**.



**Tabel 5.1** Perbedaan Berat Molekul (BM) Profil Pita Protein

Kelompok perlakuan	Berat molekul (kDa)						
	182	127	112	96	87	56	46
Kontrol	✓		✓	✓	✓	✓	✓
IBD	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Terapi 1mL/ekor 2 kali sehari	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Terapi 2 mL/ekor 2 kali sehari	✓		✓	✓	✓	✓	✓

Profil pita protein serum darah pada (**Tabel 5.1**) dengan berat molekul yang berbeda-beda muncul pada setiap perlakuan. Pada kelompok tikus kontrol negatif dan pada kelompok tikus IBD yang telah mendapatkan terapi air alkali dengan dosis 2 mL/ekor, protein yang memiliki berat molekul 127 kDa tidak muncul atau tidak terekspresi. Hal ini berbeda dengan kelompok tikus kontrol positif (IBD) dan kelompok tikus IBD yang telah mendapatkan terapi dengan dosis 1 mL/ekor yang muncul adanya ekspresi pita protein dengan berat molekul 127 kDa.

**Gambar 5.5** menunjukkan adanya pita profil protein dengan berat molekul 46 kDa dan 56 kDa yang diduga sebagai albumin (Yigit Nuri *et al.*, 2001). Albumin adalah protein yang terbentuk di hati. Jumlah albumin didalam tubuh sekitar 60% dari total protein. Fungsi utama albumin dalam darah adalah mempertahankan tekanan osmotik koloid. Selanjutnya, albumin mengangkut konstituen darah yang penting, seperti obat-obatan, hormon, dan enzim. Albumin disintesis di hati dan karena itu merupakan parameter daripada fungsi hati (Kathleen and Timothy, 2011). **Gambar 5.5** menunjukan protein dengan berat molekul 182 kDa, 96 kDa, dan 87 kDa diduga sebagai

globulin (Yigit Nuri *et al.*, 2001). Globulin mewakili semua protein non-albumin. Peran globulin dalam menjaga tekanan osmotik kurang lebih seperti albumin. Kebanyakan dari Alpha<sub>1</sub> globulin adalah alpha<sub>1</sub> antitrypsin. Beberapa berperan sebagai protein pengangkut, seperti tiroid dan *cortisol-binding* globulin, globulin juga berperan dalam zona elektroforetik. Alpha<sub>2</sub> globulin termasuk serum haptoglobin (berperan sebagai pembawa tembaga), prothrombin, dan cholinesterase (yang merupakan enzim yang digunakan dalam katabolisme asetilkolin). Beta<sub>1</sub> globulin termasuk lipoprotein, transferin, plasminogen, dan protein pelengkap; Beta<sub>2</sub> globulin termasuk fibrinogen. Gamma globulin adalah imunoglobulin (antibodi). Untuk tingkat yang lebih rendah, globulin juga bertindak sebagai *transport vehicle* (Kathleen and Timothy, 2011).

Menurut Adji Dirgo (2012) protein dengan berat molekul 115– 140 kDa diduga sebagai *C-Reactive Protein* (CRP). C-Reactive Protein (CRP) adalah salah satu protein fase akut yang terdapat dalam serum normal walaupun dalam konsentrasi yang amat kecil. Dalam keadaan tertentu dengan reaksi inflamasi atau kerusakan jaringan baik yang disebabkan oleh penyakit infeksi maupun yang bukan infeksi, konsentrasi CRP dapat meningkat sampai 100 kali. Sehingga diperlukan suatu pemeriksaan yang dapat mengukur kadar CRP.

*C-Reactive Protein* dalam plasma diproduksi oleh sel hepatosit hati terutama dipengaruhi oleh Interleukin 6 (IL-6). Pada kondisi terinfeksi aktif, kadar CRP di dalam tubuh dapat meningkat hingga 100x kadar CRP pada

orang normal sehingga pengukuran CRP sering digunakan untuk mengetahui apakah pasien dalam kondisi terinfeksi atau mengalami inflamasi tertentu. Pada saat terjadi infeksi bakteri atau inflamasi, leukosit akan teraktivasi kemudian melepaskan sitokin ke aliran darah. Sitokin akan merangsang sel hati (hepatosit) untuk memproduksi CRP. CRP merupakan marker inflamasi yang diproduksi dan dilepas oleh hati dibawah rangsangan sitokin-sitokin seperti IL-6, Interleukin 1 (IL-1), dan *Tumor Necrotizing Factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ). Beberapa obat seperti colchicine dapat menghambat produksi CRP sedangkan obat immunosupresif seperti kortikosteroid dan yang lainnya atau obat anti radang (*Non Steroid Anti Inflammation Drug*) tidak dapat menghambat sekresinya. Sintesa CRP di hati berlangsung sangat cepat setelah ada sedikit rangsangan, konsentrasi serum meningkat diatas 5 mg/L selama 6-8 jam dan mencapai puncak sekitar 24-48 jam. Kadar CRP akan menurun tajam bila proses peradangan atau kerusakan jaringan mereda dan dalam waktu sekitar 24-48 jam telah mencapai nilai normal kembali.

Pada **Tabel 5.1** protein dengan berat molekul 127 kDa muncul pada kelompok kontrol positif (IBD) dikarenakan induksi indometasin menyebabkan terjadinya peningkatan sekresi HCL pada lambung, penurunan aliran darah mukosa lambung dan penurunan sekresi mucus yang dapat memicu aktifitas makrofag dalam memfagositosis sel debris dari sel nekrosis dan menginduksi keluarnya sitokin proinflamasi (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  dan IL-6) yang kemudian merangsang mediator inflamasi dan peningkatan produksi *Reactive Oxide Species* (ROS). Peningkatan ROS akan menimbulkan stress



oksidatif, menyebabkan terganggunya fungsi sel lambung. Kerusakan jaringan pada lambung mengakibatkan meningkatnya CRP (*C-Reactive Protein*) didalam aliran darah. Saat terjadi inflamasi pada jaringan level CRP meningkat dan ketika inflamasi sudah teratasi level CRP menurun, membuat protein ini sangat berguna sebagai marker dari aktivitas suatu penyakit (WHO, 2014).

Pemberian terapi dengan dosis 2 mL/ekor protein dengan berat molekul 127 kDa tidak terekspresi seperti pada tikus kelompok kontrol negatif. Tidak terekpresinya protein dengan berat molekul 127 kDa diduga karena pengaruh dari air alkali. Hal ini disebabkan karena air alkali memiliki pH diatas 7, molekul air mikro kluster, nilai ORP negatif, serta memiliki kandungan antioksidan tinggi yang diperoleh dari proses elektrolisis air yang menghasilkan molekul hidrogen aktif sebagai reduktor kuat, yang berfungsi sebagai H-donor. Molekul hidrogen aktif menyumbangkan elektronnya pada sel yang kehilangan elektron akibat diambil oleh radikal bebas, sehingga dapat menetralkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Shirahata *et al.*, 2012). Penetralkan ROS akan menimbulkan turunnya stress oksidatif, selanjutnya akan mengembalikan fungsi sel lambung. Perbaikan jaringan pada lambung dapat menghambat terjadinya inflamasi sehingga produksi CRP (*C-Reactive Protein*) didalam aliran darah menurun.

Pada kelompok tikus yang diterapi dengan air alkali dengan dosis 2 mL/ekor tidak terekspresi pita protein dengan berat molekul 127 kDa (**Tabel 5.1**). Hal ini menunjukkan hasil yang sama pada kelompok kontrol negatif

yaitu tidak terekspresi/ tersintesis protein 127 kDa. Hasil ini telah menunjukkan bahwa terapi air alkali 2 mL/ekor dapat menghentikan sintesis protein 127 kDa yang terjadi pada kondisi IBD (kontrol positif).



## BAB 6. PENUTUP

### 6.1 Kesimpulan

1. Terapi air alkali dengan dosis 2 mL/ekor efektif dalam memperbaiki histopatologi sel-sel epitel dan sel parietal mukosa lambung.
2. Terapi air alkali mampu menghambat sintesis *C-Reactive Protein*. Volume pemberian terapi air alkali 2 mL/ekor adalah dosis terbaik yang mampu menghambat sintesis pita profil protein dengan berat molekul 127 kDa.

### 6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui dosis optimal dengan memperpanjang lama terapi serta dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui karakteristik pita profil protein yang muncul.

## DAFTAR PUSTAKA

- Achkar, J. P. 2000. *Inflammatory bowel disease*. The American College of Gastroenterology. <http://www.acg.gi.org.html>. (akses 16 februari 2017)
- Adji, Dirgo. 2012. *Analisis Leukosit Total, C-Reactive Protein (CRP) dan Fibrinogen untuk Evaluasi Kebocoran Hasil Operasi Enterektom*. Jurnal Sain Veteriner ISSN : 0126 - 0421
- AOAC, International. 2005. *Officials Methods of Analysis of AOAC International*. 2 Vols. 16 Edition, Arlington VA. USA. Association of Analytical Community.
- Aulanni'am; A. Roosdiana NL. Rahmah. 2012. The Potency of Sargassum Duplicatum Bory Extract On Inflammatory Bowel Disease Therapy In Rattus norvergicus. *Journal of Life Sciences* 6: 144- 154. <Http://www.davidpublishing.com>
- Baker, H. J., J. Lindsey, Russell, S. H. Weisbroth. 1979. *The laboratory rat. Vol, 1. Biology and Diseases*. USA: Academic Press
- Basivireddy, J. M., R. Jacob, R. Prabhu, A. B. Pulimood, and K. A. Balasubramanian. 2002. *Indometachin-Induced Free Radical Mediated Changes in The Intestinal Brush Border Membranes*. *Biochem Pharmacol*. 65: 683-695
- Bloom dan Fawcett. 2002. *Buku Ajar Histologi*. Edisi 9. Jakarta : EGC.
- Campbell, K.J. and N.D. Perkins. 2006. Regulation of NF-kappaB Function. *Biochem Soc Symp*. 73: 165-180.
- Chertow, B. 2004. *Advance in Diabetes for Millenium: Vitamins and Oxidant stress in Diabetes and Its Complication*. Marshall University. Huntington.
- Corridoni, D., K. O. Arseneau, F. Cominelli. 2014. Inflammatory Bowel Disease. *Immunology Letters*. 161: 231-235.
- Danastri Gusti Ayu Mahaprani dan Ida Bagus Darma Putra. 2011. *Inflammatory Bowel Disease*. Divisi Bedah Digestif/SMF Ilmu Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Udayana/Rumah Sakit Umum Pusat Sanglah Denpasar.
- Danelius, M., A. Ost, A. B. Lapidus. 2009. Inflammatory bowel disease-related lesions in the duodenal and gastric mucosa. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*.;44:441-5.
- Darson, H. F., M. Albayrak, F. Bilici, H. Koc, T. Hakan, Candar, and O. Kukula. 2009. *Gastroprotective and Antioxidant Effect of Opipramol on Indometachin induced Ulcer Rats*. *Yakugaku Zasshi* 129 (7) : 861 869.

- Dorland. 2002. *Kamus Saku Kedokteran Dorland*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Fatchiyah,. S. Widyarti, E. L. Arumningtyas., dan S. Permana. 2012. *Buku Praktikum Teknik Analisis Biologi Molekuler*. Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.
- Fornai, M., L. Antonioli, dan R. Colluci. (2011). *Pathophysiology of Gastric Ulcer Development and Healing: Molecular Mechanisms and Novel Therapeutic Options*. Departement of Internal Medicine, University of Pisa, Italy. Page 113-142
- Fournier, B.M. 2012. The Role of *Neutrophils* During Intestinal Inflammation. Epihelial Pathobiology Research Unit. USA: Departement of Pathology and Laboratory Medicine, Emory University School of Medicine, Atlanta, Georgia.
- Geboes K. 2003. *Histopathology of Crohn' Disease and Ulcerative Colitis*. IBD4E-18(255-276)
- Guyton A. C., and J. E. Hall. 2007. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Edisi 9. Jakarta: EGC
- Hamasaki, T., T. Kashiwagi, T. Imada, N. Nakamichi, S. Aramaki, K. Toh. 2008. *Kinetic analysis of superoxide anion radicalscavenging and hydroxyl radical-scavenging activities of platinum nanoparticles*. *Langmuir*, 24, 7354e7364.
- Houser, K., D.K. Johnson and F.T. Ishmael. 2012. Antiinflammatory Effects of Methoxyphenolic Compounds on Human Airways Cells. *Journal of Inflammation*, 4(9)
- Indraswari, I., Umi, K., dan Sudjari. 2004. Pengaruh Pemberian Temulawak Pada Lambung Tikus Yang Mengalami Ulkus Peptikum Akibat Induksi Indometasin. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. Vol. XX, No.2, Malang.
- Iwama, G. K., L. O. B. Afonso, dan M. M. Vijayan. 2004. *Stress in Fish*. AquaNet Workshop on Fish Welfare.
- Junqueira, L.C and J. Carneiro. 2004. *Basic Histology Text and Atlas*. McGraw Hill Education, New york city, US.
- Kajita, M., K. Hikosaka, M. Iitsuka, A. Kanayama, N. Toshima, N., & Y. Miyamoto. 2007. Platinum nanoparticle is a useful scavenger of superoxide anion and hydrogen peroxide. *Free Radical Research*. 41, 615e626.

- Kappelman, M., S. L. Rifas-Shiman, and K. Kleinman. 2007. The Prevalence and Geographic Distribution of Crohn's Disease and Ulserative Colitis in the United States. *Clin Gastrointestinal hepatol* 5:1424: 9
- Kathrani, A., D. Werling and K. Allenspach, 2011. Canine breeds at high risk of developing inflammatory bowel disease in the south-eastern UK. *Veterynary Record*. 169(24):635.
- Kazuhide H, E. Umegaki, T. Watanabe, Y. Yoda, E. Morita, M. Murano, S. Tokioka and T. Arakawa. 2009. Present status and strategy of NSAIDs-induced small bowel injury. *Journal Gastroenterol* 44:879–888
- Kelompok Studi Inflammatory Bowel Disease Indonesia. 2011. *Konsensus nasional penatalaksanaan inflammatory bowel disease (IBD) di Indonesia*. Jakarta: Perkumpulan Gastroenterologi Indonesia.
- Kim, J. M. and K. Yokohama. 1997. Effects of alkaline ionized water on spontaneously diabetic GKratsfed sucrose. *Korean J. Lab. Anim. Sci.* 13: 187-190.
- Korpacka, M. K., K. Neubauer , and M. Matusiewicz . 2009. Platelet- Derived Growth Factor-Bb Reflects Clinical, Inflammatory Bowel Disease. *Clinical Biochemisttry*. 42; 602- 1609.
- Krieglstein Christian F., Christoph Anthoni, Emile J.M. Rijcken, Mike Laukötter, Hans-Ulrich Spiegel, Sven E. Boden, Stephan Schweizer, Hasan Safayhi, Norbert Senninger, Guido Schürmann. 2001. Acetyl-11-keto- $\beta$ -boswellic acid, a constituent of a herbal medicine from *Boswellia serrata* resin, attenuates experimental ileitis. *International Journal of Colorectal Disease* Volume 16, Issue 2, pp 88–95.
- Kumar V., Cotran R.S., Robbins SL. 2007. *Buku Ajar Patologi Robbins 2* (7th ed). Jakarta: EGC.
- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan Dan Rancangan Acak Lengkap*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga Surabaya.
- Kusumawati, D., 2004. *Bersahabat dengan Hewan Coba*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Mansjoer S. 2003. *Mekanisme Kerja Obat Anti Radang*. <http://www.library.usu.ac.id/download/fk/farmasi-Soewarni.pdf>.
- Martin, P and S.J. Leibovich. 2005. *Inflammatory Cells During Wound Repair*: J. Trends in Cell Biology 15 (11): 599-607.
- Neuman, M.G. and R.M. Nanau. 2011. Inflammatory Bowel Diase: Role Of Diet, Microbiota, Life Style. *Translational Research*. 160(1):29-44.



- Nuri Yigit, Reyhan Verimli, Ercument Colak, Mustafa Sozen. 2001. *Blood-Serum Proteins of Rattus rattus and Rattus norvegicus (Mammalia: Rodentia) in Turkey*. Turk J Biol. Department of Biology, Faculty of Science, Ankara University, 06100, Beşevler, Ankara-Turkey
- Pagana Kathleen Deska and Timothy J. Pagana. 2011. *Mosby's Diagnostic and Laboratory Test Reference Tenth Edition*. Elsevier Mosby, St. Louis Missouri. ISBN: 978-0-323-07405-6.
- Pearce, E. C. 2006. *Anatomy & Physiology for Nurses*. Penerjemah: Handoyo, S.Y., dan Mohamad, K. (2008). Anatomi dan Fisiologi untuk Paramedis. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama. Halaman 185 - 188.
- Piepoli, A. L., G. De Salvatore, M. A. De Salvia, C. L. Mitolo, G. Siro-Brigiani, P. Portincasa. 2005. Indometachin-induced ileitis is associated with tensiometric, vascular and oxidative changes in the rat experimental model. *Eur J Clin Invest* 35: 271-278.
- Podolsky, D. K. 2002. Inflammatory Bowel Disease. *N. Engl. J. Med.* 347 (6): 417- 429
- Powers, S. K., M. J. Jackson. 2008. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiol Rev*, 88, 1243-76.
- Pratiwi, A. D., Aulanni'an, dan Sutrisno. 2013. Aktivitas Protease dan Profil Protein pada Hepar Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) pasca induksi cyclosporine-A. *Kimia Student Journal*. Vol 1.No 1, pp 105-111
- Price, S. A. dan L. M. Wilson. 2006. *Patofisiologi : Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit, Edisi 6, Volume 1*. Jakarta: EGC.
- Sakuraba Atsushi, Yasushi Iwao, Katsuyoshi Matsuoka, Makoto Naganuma, Haruhiko Ogata, Takanori Kanai, and Toshifumi Hibi. 2014. Endoscopic and Pathologic Changes of the Upper Gastrointestinal Tract in Crohn's Disease. Hindawi Publishing Corporation, *BioMed Research International*, Volume 2014, Article ID 610767
- Scholz, M., A. L. Blobaum, L. J. Mamett and E. H. Hawkins. 2011. Synthesis And Evaluation of Carbaborane Derivatives of Indometasin as Cyclooxygenase Inhibitors. *Bioorganic and Medical Chemistry*. 19; 3242-324.
- Shirahata S; T Hamasaki; K Teruya. 2012. Advanced research on the health benefit of reduced water. *Trends in food science & technology*. 23: 124-131
- Shirahata S; Y Li; T Hamasaki; Z Gadek; K Teruya; S Kabayama. 2007. Redox regulation by reduced water as active hydrogen donors and intracellular



ROS scavengers for prevention of type 2 diabetes. In E. Smith (Ed.), *Cell technology for cell products* (pp. 99e101). Dordecht: Springer.

- Singh N., V.K. Verma, P.S. Saxena, and R. Singh. 2012. *Anti-Ulcer and Antioxidant Activity of Moringa Oleifera (Lam) Leaves against Aspirin and Ethanol Induced Gastric Ulcer in Rats*. Journal of Pharmaceuticals 2(2): 46-57.
- Sirois. 2005. *Laboratory Animal Medicine: Principles and Procedures*. USA: Elsevier.
- Solanki, R., D. Madat, K. Chauhan and L. Parmar. 2010. *Recent Approaches in Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease*.
- Suckow, M. A., S. H. Weisbroth, and C. I., Franklin. 2006. *The Laboratory Rat*. Elsevier Academic Press. USA.
- Suryanto, E. 2003. Patogenesis Asma. In: Abdullah HA, Patau MJ, Susilo HT, Saleh K, Tabri NA, Mappangara I. *Pertemuan Ilmiah Khusus (PIK) X Paru, Sub Bagian Paru-Bagian Ilmu Penyakit Dalam FK-UNHAS /RS Dr. Wahidin S: Makasar*. pp.35-41.
- Takeuchi, K; A. Tanaka; R. Ohno and A. Yokota. 2003. *Role of COX Inhibition in Pathogenesis of NSAID-Induced Small Intestinal Damage*. Kyoto Pharmaceutical University, Kyoto.
- Tanaka, A., M. Matsumoto, A. Nakagiri, S. Kato and K. Takeuchi. 2013. *Flavonoid for Effect NSAID-Induced Intestinal Damage: Role of COX Inhibitor*. Inflammopharmacology. 10 (4-6) : 313- 325.
- Vorobjova, N. V. 2005. Selective stimulation of the growth of anaerobic microflora in the human intestinal tract by electrolyzed reducing water. *Med. Hypotheses* 64: 543-546.
- Westmermer. 2004. *Electrophoresis in Practice: A Guide to Theory and Practice*. New-Jersey Wiley & Son inc.
- WHO. 2014. *C-reactive protein concentrations as a marker of inflammation or infection for interpreting biomarkers of micronutrient status*. Department of Nutrition for Health and Development (NHD) World Health Organization Avenue Appia 20, 1211 Geneva 27, Switzerland
- Wilson, K., J. Walker. 2000. *Principles and Techniques of Practical Biochemistry Fifth Edition*. United Kingdom: Cambridge University Press.
- Yamada T. 2005. Inflammatory Bowel Disease. *Handbook of Gastroenterology*. 2nd Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Willkins. P. 357- 73.